Mircea Ioan Popa

Diagnosticul de laborator în microbiologie

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fil 20.424

editura
INFO Medica

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAŞI
II 20. 424

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE
„CAROL DAVILA"

Mircea Ioan Popa M.D., Ph.D., M.P.H.
Conferenţiar universitar

489277

Diagnosticul de laborator în microbiologie

427035
B.C.U. IASI

ALE

editura INFOMedica
Bucureşti
2004

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale
POPA, MIRCEA IOAN
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN MICROBIOLOGIE /
Mircea Ioan Popa - Bucureşti; Infomedica, 2004
Bibliogr.
ISBN 973-7912-37-3

579.616.074

© 2004 - **Infomedica** s.r.l.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN MICROBIOLOGIE
MIRCEA IOAN POPA

ISBN: 973-7912-37-3

Toate drepturile rezervate Editurii INFOMEDICA.
Nici o parte din acest volum nu poate fi copiată
fără permisiunea scrisă a Editurii INFOMEDICA.
Drepturile de distribuţie în străinătate aparţin în exclusivitate editurii.
Copyright ©2004 by INFOMEDICA s.r.l. All rights reserved.

APĂRUT 2004

REFERENŢI ŞTIINŢIFICI:

LUCIA DEBELEAC M.D., Ph.D.
Profesor universitar
UMF „Carol Davila" Bucureşti

ADRIAN STREINU-CERCEL M.D., Ph.D.
Conferenţiar universitar
UMF „Carol Davila" Bucureşti
Director general al Institutului de Boli Infecţioase
„Prof. Dr. Matei Balş"

GHEORGHE DIMACHE M.D., Ph.D.
Cercetător ştiinţific principal gr. I
Institutul Naţional de Cercetare-Dezvoltare
pentru Microbiologie şi Imunologie „Cantacuzino"

REDACTARE:
Mircea Ioan Popa
Gabriela Loredana Popa

Tehnoredactare computerizată: Editura INFOMedica

Tehnoredactare: Ing. Nicoleta Anghel
Dr. Mircea Ioan Popa

Editura INFOMEDICA Bucureşti
Şos. Panduri 35, Bl. P1B, Sc. A, Ap. 33-34
Tel./Fax: 021/410.04.10; 410.53.08; Tel.: 410.61.63
e-mail: redactia@infomedica.ro
www.infomedica.ro

Tipar executat la Tipografia INFOMEDICA

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

Cuvânt înainte VII

1. Elemente legate de controlul calităţii în laboratorul de bacteriologie/ microbiologie 1
Mircea Ioan Popa

PARTEA GENERALĂ

2. Elemente legate de conduita în laboratorul de bacteriologie/microbiologie. Norme de protecţie a muncii în laboratorul de microbiologie 4
Mircea Ioan Popa

3. Date privind echipamentul şi aparatura utilizate în laboratorul de microbiologie 9
Mircea Ioan Popa

4. Metode de dezinfecţie şi sterilizare utilizate în laboratorul de microbiologie 12
Mircea Ioan Popa

5. Schema generală a diagnosticului de laborator microbiologic 18
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa

6. Norme privind prelevarea şi transportul produselor patologice în diagnosticul microbiologic direct 22
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa

7. Preparate microscopice, frotiuri Şi principalele coloraţii utilizate în microbiologie 33
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa

8. Tehnica examenului microscopic în diagnosticul microbiologic 39
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa

9. Medii de cultură 45
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa

10. Tehnici de cultivare 52
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa

11. Examinarea caracterelor de cultură, metabolice precum şi a altor caractere fenotipice utile în identificarea microorganismelor 61
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa

12. Teste de identificare având la bază diferite caractere biochimice ale bacteriilor şi fungilor 70
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

13. Teste de identificare rapide/moderne 87
Mircea Ioan Popa
14. Testarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice 95
Mircea Ioan Popa
15. Reacţii antigen-anticorp utilizate în microbiologie 105
Mircea Ioan Popa
16. Reacţia de precipitare 108
Mircea Ioan Popa
17. Reacţia de aglutinare 113
Mircea Ioan Popa
18. Reacţia de fixare a complementului 117
Mircea Ioan Popa
19. Reacţia de neutralizare (seroneutralizare) 120
Mircea Ioan Popa
20. Reacţii în care componentele sunt marcate 123
Mircea Ioan Popa
21. Testarea imunităţii de tip celular 128
Mircea Ioan Popa
22. Biopreparate 133
Mircea Ioan Popa

PARTEA SPECIALĂ

23. Introducere în diagnosticul de laborator microbiologic 138
Mircea Ioan Popa
24. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Staphylococcus* 142
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa
25. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Streptococcus* 145
Mircea Ioan Popa
26. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse *Streptococcus pneumoniae* 148
Mircea Ioan Popa
27. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Neisseria* 151
Mircea Ioan Popa
28. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de enterobacterii. Coprocultura 156
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa
29. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de *Escherichia coli*. Urocultura 162
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa
30. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Shigella* 169
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa

BCU "VASILE GOLDIŞ" ARAD UNIVERSITY LIBRARY
1 6 MAI 2008

31. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Salmonella*. Hemocultura 172
Mircea Ioan Popa

32. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Klebsiella* 179
Mircea Ioan Popa

33. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Proteus* 181
Mircea Ioan Popa

34. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Yersinia* 184
Mircea Ioan Popa

35. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Pseudomonas* 186
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa

36. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Vibrio* 189
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa

37. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Haemophilus* 191
Mircea Ioan Popa

38. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Bordetella* 195
Mircea Ioan Popa

39. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse microorganisme din genul *Brucella* 198
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa

40. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de *Corynebacterium diphtheriae* 202
Mircea Ioan Popa

41. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Listeria* 205
Mircea Ioan Popa

42. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Mycobacterium* 208
Gabriela Loredana Popa, Mircea Ioan Popa, Mirela Stefan

43. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de *Bacillus anthracis* 211
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa

44. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Clostridium* 214
Mircea Ioan Popa

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

45. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Treponema* 218
Mircea Ioan Popa

46. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Leptospira* 224
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa

47. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Borrelia* 227
Mircea Ioan Popa

48. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din familia *Rickettsiaceae* 230
Mircea Ioan Popa

49. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Chlamydia* 233
Mircea Ioan Popa

50. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Mycoplasma* 235
Mircea Ioan Popa

51. Diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganisme din genul *Candida* 237
Mircea Ioan Popa

52. Diagnosticul de laborator microbiologic în infecţiile acute ale căilor respiratorii inferioare 241
Mircea Ioan Popa, Gabriela Loredana Popa

53. Elemente privind importanţa diagnosticului microbiologic în sistemul de supraveghere al bolilor transmisibile 255
Mircea Ioan Popa

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARA LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE

Acest manual de lucrări practice apare la peste 2 decenii după manualul publicat sub redacţia dlui. prof. dr. Mărăşel Georgescu, la Bucureşti.

Cele mai multe dintre datele prezentate reprezintă elemente de bază ale diagnosticului microbiologic în infecţiile produse de bacterii sau levuri. Pornind de la noţiuni privind controlul de calitate, conduita în laboratorul de microbiologie (inclusiv norme de protecţia muncii), echipamentul şi aparatura necesare în laborator, dezinfecţia şi sterilizarea am continuat cu schema generală a diagnosticului microbiologic prezentând în capitole separate principalele norme privind prelevarea şi transportul produselor patologice, realizarea preparatelor microscopice, tehnica examenului microscopic, principalele medii de cultură utilizate şi tehnicile cultivare mai frecvent folosite. În capitolele următoare am prezentat modalităţile de identificare a tulpinilor bacteriene sau levurice prin metode fenotipice şi genotipice, un capitol separat fiind dedicat studiului sensibilităţii la medicamentele antimicrobiene. După discutarea reacţiilor antigen-anticorp şi o trecere în revistă a principalelor produse biologice de uz uman am realizat trecerea către partea specială în care sunt abordate modalităţile diagnostice în infecţiile produse de principalele microorganisme. Capitolul 52 realizează o sinteză a noţiunilor prezentate în manual în timp ce ultimul capitol prezintă unele elemente privind importanţa diagnosticului microbiologic în cadrul sistemului de supraveghere al bolilor transmisibile, în România.

Alte date suplimentare pot fi studiate şi aprofundate de către cei interesaţi în o serie de manuale şi tratate de specialitate din literatura medicală românească şi internaţională.

După opinia noastră (formată în 14 ani de activitate teoretică şi practică în care am colaborat cu studenţi la medicină sau colegii medicale, medici rezidenţi sau specialişti, asistenţi medicali etc), microbiologia reprezintă una dintre materiile faţă de care interesul trebuie să fie sensibil mai ridicat comparativ cu ceea ce percepem că se petrece în momentul actual. Microbiologia aduce „uneltele" necesare unui diagnostic de multe ori rapid şi de cele mai multe ori foarte precis, de mare ajutor pacientului.

Aşteptăm sugestiile cititorilor, în special pe cele critice, pentru a putea îmbunătăţi conţinutul prezentului volum. Acestea pot fi transmise prin email la adresa: popalore@hades.ro.

Autorii

BCU CLUJ LIBRARY

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. ELEMENTE LEGATE DE CONTROLUL CALITĂȚII ÎN LABORATORUL DE BACTERIOLOGIE/MICROBIOLOGIE

Cu toate că aceste noţiuni nu par a fi de utilitate imediată, ***trebuie să avem în vedere faptul că ele sunt incluse într-unul dintre cele mai importante capitole ale activităţii,*** în orice tip de laborator şi nu numai în laboratorul de microbiologie.

De fapt, cu cât sunt înţelese mai de timpuriu, cu atât pot fi mai utile în dezvoltarea viitoare a oricărui medic, care mai devreme sau mai târziu va trebui să înţeleagă importanţa laboratorului clinic în general şi respectiv a laboratorului de microbiologie în particular, în colaborare cu celelalte specialităţi medicale. Am decis să introducem aceste elemente în primul capitol al manualului de lucrări practice. Considerăm necesară parcurgerea acestor noţiuni de către **toţi colegii implicaţi** în diferitele activităţi desfăşurate în sistemul sanitar. Recomandăm citirea şi altor materiale redactate pe această temă, din literatura medicală românească sau internaţională.

În orice laborator, inclusiv în laboratorul de microbiologie al UMF „Carol Davila", este necesară stabilirea unor responsabilităţi. Chiar şi în cazul în care activitatea practică se rezumă la o serie de demonstraţii şi prezentarea unor anumite aspecte pentru tinerii aflaţi în stagiu, elementele legate de controlul calităţii nu trebuie să fie ignorate.

Atunci când este vorba de un laborator clinic de microbiologie, iar de rezultatele obţinute poate depinde evoluţia şi uneori chiar viaţa unui pacient, **controlul intern de calitate** intră în responsabilitatea şefului de laborator, care trebuie să supervizeze (direct sau prin delegare de responsabilitate) toate activităţile desfăşurate şi să contrasemneze buletinele de analiză.

1. Într-un sistem medical bine pus la punct, buletinele de analiză nesemnate, semnate indescifrabil, verificate numai de către personalul medical cu pregătire medie etc., trebuie să dispară şi să fie înlocuite de buletine de analiză redactate după toate rigorile, incluzând supervizarea menţionată mai sus.

2. În fiecare laborator trebuie să existe şi să fie accesibil oricărui membru al personalului de laborator un document scris, fie sub forma unui manual tehnic, fie sub forma unui dosar în care să fie incluse o serie de materiale, după cum urmează:

- Un tabel nominal al personalului, date tehnice despre fiecare membru precum şi date care să permită contactarea unei anume persoane în caz de necesitate
- Un regulament de ordine interioară, inclusiv normele de protecţie a muncii şi normele de securitate microbiologică, precum şi descrierea sarcinilor fiecărui membru al personalului de laborator
- O listă cuprinzând toate formularele utilizate în laborator precum şi descrierea fiecărui formular în parte, inclusiv recomandări privind modul de completare al formularelor
- Un plan al laboratorului
- O listă a analizelor care pot fi efectuate în laborator
- Tehnicile de identificare a microorganismelor izolate, pornind de la normele de recoltare, conservare şi transport (pentru fiecare tip de produs în parte), testele uti-

lizate, lista mediilor de cultură şi a reactivilor utilizaţi, inclusiv modul de preparare al acestora.

În mod ideal (pentru că deocamdată aceste recomandări nu sunt aplicate în toate laboratoarele din ţara noastră) ar trebui ca manualul (dosarul tehnic) să fie **revizuit şi completat periodic** şi să includă normele metodologice redactate şi transmise de către instituţia care se ocupă de coordonarea şi controlul activităţii desfăşurate în sistemul laboratoarelor de microbiologie din România precum şi actele normative (recomandări, ordine de ministru, ordonanţe de guvern, legi etc) apărute în legătură cu activitatea de laborator.

Cele menţionate mai sus sunt valabile pentru laboratoarele de microbiologie, dar în parte, se pot aplica oricărui tip de laborator clinic.

3. În mod necesar, periodic, în cadrul laboratorului trebuie organizate scurte întâlniri care să permită schimbul de opinii între membrii personalului de laborator, prezentarea unor referate alcătuite după materiale de specialitate apărute în literatura naţională sau internaţională, discutarea unor aspecte legislative legate de activitatea de laborator etc.

4. O modalitate obiectivă a controlului intern de calitate este reprezentată de solicitarea (de către şeful de laborator, care va efectua şi verificarea rezultatelor) realizării unor teste având la dispoziţie probe „oarbe", rezultatul corect fiind cunoscut numai de către cel care a pregătit proba respectivă şi respectiv de către şeful de laborator.

5. În protocolul de lucru, pentru fiecare test în parte, este notificată utilizarea unui control pozitiv şi respectiv a unui control negativ (spre exemplu în cazul testului susceptibilităţii la bacitracină, controlul pozitiv va fi reprezentat de o tulpină de *Streptococcus pyogenes,* iar controlul negativ va fi reprezentat de o tulpină de *Streptococcus agalactiae),* astfel putându-se valida rezultatele obţinute.

În mod complementar, **controlul de calitate extern** ar trebui să condiţioneze autorizaţia eliberată pentru funcţionarea oricărui laborator de microbiologie clinică, atât în sistemul public cât şi în cel privat. Din punct de vedere operaţional, fiecare laborator ar trebui să primească:

- un număr de cod, care este cunoscut de laboratorul respectiv şi de către instituţia care organizează controlul extern de calitate;
- periodic, un număr de probe, al căror rezultat va fi verificat (pentru examene bacteriologice, micologice şi serologice);
- formulare standardizate pentru re-transmiterea rezultatelor obţinute.

Îndeplinirea recomandărilor menţionate mai sus va conduce implicit la protecţia pacienţilor, identificarea unor anumite erori, compararea rezultatelor la nivel naţional, posibilitatea colaborării la nivel internaţional, realizarea unei standardizări în microbiologia clinică românească, creşterea încrederii tuturor partenerilor din sistemul sanitar.

Identificarea unor modalităţi de lucru necorespunzătoare ar trebui să conducă la retragerea autorizaţiei de funcţionare cu reacordarea acesteia numai după îndeplinirea tuturor criteriilor necesare unei activităţi utile diagnosticului şi care să nu pună în pericol sănătatea sau viaţa pacienţilor.

Controlul calităţii la nivelul oricărui laborator va atinge eficienţa maximă cu condiţia unei colaborări între clinică şi laborator. Sunt încă prea frecvente situaţiile în care solicitarea

unui examen de laborator este făcută fără responsabilitate, fără colegialitate şi fără a avea suficient în vedere interesul pacientului. Atât personalul medical din laborator cât şi cel din clinică trebuie să acţioneze în strânsă colaborare. Numai în acest caz rezultatele obţinute pot fi corect interpretate, eventualele rezultate care par incorecte pot fi analizate şi corelate cu situaţia concretă, particulară a unui anume pacient, iar în cazul persistenţei suspiciunii unei erori de laborator se poate solicita în cunoştinţă de cauză repetarea unei analize sau se poate realiza prelevarea unui nou produs patologic sau a unei probe de sânge pentru obţinerea serului de cercetat.

În vederea stabilirii unei bune colaborări trebuie să existe o comunicare permanentă între colegii care îşi desfăşoară activitatea în clinică şi în laborator.

Trebuie să recunoaştem că din păcate buna colaborare şi comunicare între verigile sistemului de sănătate reprezintă încă un deziderat neatins în ţara noastră, cu relativ **puţine excepţii.** Pornind de la buletinul de analiză şi documentele tehnice care trebuie să fie disponibile atât pentru laborator cât şi pentru clinică, continuând cu scrisorile metodologice care au devenit din ce în ce mai rare în ultimii 10-15 ani trebuie găsite cele mai bune soluţii de comunicare colegială şi ştiinţifică. Este datoria managerului instituţiei medicale ca, împreună cu şeful laboratorului şi şefii secţiilor clinice, să faciliteze organizarea unor întâlniri periodice între colegi.

Trebuie discutate şi agreate în mod colegial criteriile care pot conduce, spre exemplu, la respingerea unor probe. Trebuie desfiinţată modalitatea de lucru în care se acceptă pentru lucru în laborator orice probă, indiferent de modul în care a fost recoltată, transportată şi indiferent dacă este însoţită (sau nu) de un buletin care solicită o anumită examinare şi care ar trebui să menţioneze o serie de date strict necesare. În loc să fie prelucrate probe fără calitate, care nu au cum să conducă la realizarea unui diagnostic microbiologic corespunzător şi util pacientului care prezintă o infecţie de etiologie probabil microbiană, este de preferat ca aceste probe să fie respinse şi să se solicite o nouă recoltare, corespunzătoare calitativ şi cantitativ.

Înainte de a încheia această destul de sumară prezentare, dorim să subliniem încă o dată că aceste noţiuni ar trebui cunoscute şi aplicate deopotrivă în sistemul public şi privat.

Controlul intern şi extern de calitate trebuie să reprezinte o prioritate absolută pentru sistemul naţional de sănătate iar elementele legate de acesta ar trebui să fie cunoscute încă din perioada de pregătire de bază a oricărui medic, biolog sau asistent medical.

BCU IASI

PARTEA GENERALĂ

2. ELEMENTE LEGATE DE CONDUITA ÎN LABORATORUL DE BACTERIOLOGIE/MICROBIOLOGIE. NORME DE PROTECȚIE A MUNCII ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

Ţinta activităţii în laboratorul de bacteriologie/micologie ar putea fi definită foarte pe scurt drept stabilirea tratamentului care trebuie urmat în cazul unui pacient care prezintă o boală infecţioasă de etiologie bacteriană/fungică. De fapt lucrurile sunt mult mai complicate, datele de laborator nu pot fi interpretate în lipsa unei pregătiri serioase atât din punct de vedere teoretic cât şi practic, în lipsa unei activităţi susţinute în perioada de pregătire care durează mai mulţi ani şi de fapt continuă toată viaţa.

Ceea ce trebuie să fie însă foarte clar încă de la început este că, fără respectarea unor principii, în condiţiile efectuării sau interpretării mecanice a unor teste etc., diagnosticul de laborator microbiologic corect devine imposibil.

În vederea atingerii scopului, în laboratorul de bacteriologie se vor efectua tehnicile necesare:

- stabilirii prezenţei sau dovedirii absenţei unor anumite bacterii la nivelul unui anumit substrat;
- studierii bacteriilor izolate pentru identificarea genului, grupului, speciei, tipului (de la caz la caz) având la bază o serie de caractere ale bacteriilor, precum:
  - caracterele morfotinctoriale;
  - caracterele de cultură;
  - caracterele biochimice (pigmentogeneza, sinteza altor factori care pot fi evidenţiaţi macroscopic, sinteza unor enzime, sinteza de bacteriocine, capacitatea de a fermenta un anumit substrat, capacitatea de a folosi un anumit substrat drept unică sursă de carbon etc);
  - caracterele antigenice (utilizând tehnici din domeniul imunologiei);
  - caracterele de patogenitate;
  - sensibilitatea faţă de bacteriofagi;
  - caractere legate de sinteza anumitor metaboliţi sau structuri moleculare identificabile spre ex. prin tehnici de cromatografie;
  - caracterele genetice etc;
- stabilirii faptului că bacteria izolată este implicată în procesul infecţios respectiv;
- stabilirii sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice;
- monitorizării evoluţiei sub tratament (dovedirea eficienţei tratamentului antibacterian ales);

- identificării contaminării de laborator;
- depistării purtătorilor de germeni etc.

Chiar dacă cele menţionate mai sus par complicate, ele reprezintă o simplificare în raport cu complexitatea activităţii din laboratorul de bacteriologie.

Pentru îndeplinirea obiectivelor, laboratorul de bacteriologie trebuie astfel conceput încât condiţiile de lucru să fie optime. În plus, trebuie să avem în vedere că în momentul efectuării oricărei tehnici de laborator, este necesar să fie asigurată protecţia personalului de laborator precum şi prevenirea contaminării probelor de lucru. Toate elementele necesare trebuie să apară scrise manualul tehnic menţionat în cadrul capitolului precedent.

Clădirea laboratorului de bacteriologie medicală trebuie să asigure, pe cât posibil, prevenirea expunerii la praf, curenţi de aer, să fie luminoasă şi în măsura posibilităţilor spaţiile de lucru să fie orientate astfel încât să prevină incidenţa directă a razelor solare (având în vedere efectul bactericid al radiaţiilor UV; acest element este de maximă importanţă în laboratorul de mycobacteriologie).

Fiecare încăpere a laboratorului de bacteriologie trebuie să aibă o destinaţie precisă iar planul laboratorului în ansamblu trebuie să prevadă un anumit „flux", pe cât posibil într-un sens unic în vederea prevenirii contaminării preparatelor de laborator şi respectiv prevenirea „întâlnirii" dintre materialele contaminate şi materialele sterile.

Laboratorul de bacteriologie medicală include încăperi (spaţii) în vederea desfăşurării corespunzătoare a următoarelor activităţi:

- recepţionarea probelor recoltate în afara laboratorului;
- recoltarea probelor în laborator;
- prelucrarea probelor în vederea cultivării, identificării bacteriilor implicate etiologic, prin diferitele tehnici bacteriologice;
- realizarea diferitelor tehnici imunologice utile în diagnosticul bacteriologic sau imunologic;
- pregătirea materialelor necesare în laborator;
  - ❖ sticlărie;
  - ❖ alte instrumente de laborator;
  - ❖ reactivi;
  - ❖ medii de cultură etc;
- depozitarea materialelor necesare în laborator;
- spălarea materialelor înainte de sterilizare etc.

În afară de cele menţionate mai sus, în laboratorul de bacteriologie mai există spaţii destinate activităţilor administrative (birouri), vestiare, grupuri sanitare etc.

În cazul unor laboratoare specializate (de ex. studiul acizilor graşi prin tehnici de cromatografie, studiul caracteristicilor bacteriene prin tehnici de biologie moleculară etc.), există anumite particularităţi în planificarea şi distribuirea spaţiilor funcţionale din laborator; elementele tehnice legate de aceste structuri sunt prezentate în diferite manuale tehnice care pot fi consultate de către cei interesaţi.

Încăperile, spaţiile, mobilierul din laboratorul de bacteriologie vor fi construite în aşa fel încât să permită realizarea unei curăţenii şi dezinfecţii la cel mai înalt nivel; în cazul aces-

tui tip de laboratoare se poate vorbi de necesitatea atingerii perfecţiunii. Va fi acordată toată atenţia pentru ca laboratorul să fie organizat în vederea

- realizării scopului menţionat mai sus prin tehnicile enumerate;
- prevenirii contaminării probelor de laborator;
- prevenirii răspândirii germenilor în mediul ambiant;
- prevenirii infecţiilor de laborator.

Înainte de a încheia prezentarea principalelor încăperi (spaţii) din laboratorul de bacteriologie, dorim să menţionăm că:

- structura prezentată pentru laboratorul de bacteriologie nu diferă în mod esenţial de structura unui laborator de microbiologie în general;
- în structura laboratorului este de dorit să fie incluse (în măsura posibilităţilor şi în funcţie de nivelul laboratorului, de exemplu în cazul unui laborator de spital universitar) spaţii în care să se poată desfăşura activităţi de învăţământ şi pregătire teoretică şi practică, spaţii în care ar putea avea loc şi diferite întâlniri tehnice între membrii personalului de laborator;
- laboratorul trebuie să fie legat funcţional de clinică.

Datele privind funcţionarea laboratoarelor care efectuează analize medicale sunt incluse în Ordinul ministrului sănătăţii nr. 119/2004, normativ aduce la zi Ordinul ministrului sănătăţii şi familiei nr. 609/2002, precedat de Ordinul ministrului sănătăţii nr. 915/2000. Aceste acte normative trebuie revizuite şi adaptate periodic.

NORME DE PROTECŢIE A MUNCII ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

În laboratorul de microbiologie se lucrează cu microorganisme potenţial patogene sau dovedite a fi patogene, care se pot identifica în diferite produse patologice (ex. sânge, materii fecale, urină etc) sau au fost izolate în culturi la nivelul laboratorului. Există şi posibilitatea ca un anumit laborator să primească spre identificare culturi şi izolate de la un laborator cu un nivel de competenţă inferior.

Chiar dacă activitatea se desfăşoară într-un laborator dedicat lucrărilor practice şi demonstraţiilor făcute sub supravegherea unui cadru didactic pentru studenţi sau tineri medici rezidenţi, există o serie de reguli care trebuie aplicate cu stricteţe în vederea eliminării riscurilor de contaminare:

1. Este strict interzis accesul persoanelor străine în laborator. Tinerii medici sau viitori medici vor accede în laborator şi vor participa la desfăşurarea lucrărilor practice numai după audierea şi însuşirea (dovedită prin semnătura pe un proces verbal pregătit în acest sens) regulilor de protecţie a muncii.

2. Toate produsele biologice vor fi considerate ca potenţial infectante.

3. Este obligatorie purtatea echipamentului de protecţie; halatul de protecţie reprezintă nivelul minim acceptat. Halatul trebuie să fie curat şi corect încheiat. În anumite situaţii se va recomanda utilizarea mănuşilor, ochelarilor, măştii, bonetei, şorţului, încălţămintei de protecţie. Se recomandă ca echipamentul de protecţie să fie păstrat separat de hainele utilizate în exterior.

4. Nu se vor purta mănuşi de latex în momentul manipulării becului Bunsen.

5. Mâncatul şi băutul sunt interzise în sala de lucrări practice de microbiologie. Fumatul este interzis, conform legii, în orice instituţie medicală din România şi cu atât mai mult nu este acceptat într-un laborator de microbiologie.

6. Se interzice aplicarea de cosmetice, lăcuirea unghiilor, purtarea de unghii false, manipularea lentilelor de contact etc.

7. Este interzisă introducerea în gură a oricărui obiect.

8. Pipetarea cu gura este strict interzisă. În vederea pipetării se vor utiliza dispozitive de pipetare adecvate.

9. Nu este permisă depozitarea obiectelor de uz personal pe masa de lucru (haine, genţi, serviete, caiete etc). Se recomandă ca hainele să fie lăsate la garderobă sau într-un spaţiu special amenajat.

10. Manipularea materialului contaminat se va realiza cu maximă precauţie pentru evitarea răspândirii microorganismelor. Activităţile se vor desfăşura în vecinătatea becului Bunsen aprins.

11. Însămânţările se efectuează „la flacără". Se vor flamba gurile tuturor recipientelor (tub, eprubetă, flacon de sticlă etc) utilizate, atât la deschidere cât şi la închidere.

12. Ansa bacteriologică se va steriliza „la roşu", atât bucla cât şi firul ansei (iar portansa se va flamba) înainte şi după folosire. Atunci când s-a terminat lucrul cu ansa încărcată cu produs patologic, în vederea sterilizării bucla ansei va fi introdusă iniţial „la baza flăcării" unde temperatura este mai scăzută, pentru a preveni împroşcarea cu particule infecţioase. Atunci când se lucrează într-un laborator de analize se vor lua preacauţii suplimentare.

13. Se vor utiliza anse bacteriologice corect şi complet închise şi cu o buclă cu diametrul mai mic de 3 milimetri pentru a se evita descărcarea spontană. Nu se vor face mişcări bruşte atunci când ansa este încărcată cu produs patologic. Se vor evita gesturile ample şi se va menţine un permanent control asupra mişcărilor efectuate în laboratorul de microbiologie.

14. Recomandăm ca toate activităţile care pot fi efectuate în laborator să fie înscrise şi detaliate în manualul tehnic al laboratorului. Înainte de începerea oricărui test sau a oricărei manevre, trebuie să avem în minte toţi „paşii" pe care urmează să îi facem (conform protocolului de lucru) astfel încât să avem un control mental permanent al fiecărei manevre pe care urmează să o executăm.

15. Nu este permisă fuga şi nici mersul rapid prin laborator.

16. Pipetele contaminate (pipete Pasteur, pipete gradate etc) nu se vor decontamina la flacără, ci vor fi introduse (evitând producerea de stropi potenţial infectanţi) în flaconul cu dezinfectant (lichidul dezinfectant trebuie să depăşească nivelul până la care a ajuns produsul contaminant), unde vor fi menţinute pentru circa 24 ore (în funcţie de substanţa dezinfectantă utilizată). Flaconul cu amestec dezinfectant este obligatoriu. Tot în amestecul dezinfectant vor fi introduse cu aceleaşi precauţii lamele de sticlă folosite.

17. Toate celelalte obiecte contaminate (exceptând ansele bacteriologice, pipetele şi lamele) se vor introduce la finalul activităţii practice, cu precauţie, într-un recipient (ex. o găleată din metal, cu capac) care va fi autoclavată.

18. Se va restrânge pe cât posibil utilizarea obiectelor ascuţite, tăietoare şi înţepătoare.

19. Pentru îndepărtarea obiectelor ascuţite de unică întrebuinţare recomandăm utilizarea de „cutii sigure" în care acestea să fie colectate. Aceste cutii vor fi ulterior incinerate.

20. În cazul în care are loc accidental contaminarea unei suprafeţe cu produse patologice sau culturi, în cazul în care acest eveniment se datorează unui tânăr medic sau viitor medic aflat în pregătire, în primul rând trebuie anunţat fără întârziere asistentul responsabil cu pregătirea respectivei grupe de lucru. Se recomandă acoperirea cu o pânză a suprafeţei contaminate după care se toarnă o soluţie dezinfectantă care se va menţine pe loc în funcţie de recomandările producătorului, dar nu mai puţin de 30 minute. Ulterior se poate trece (după caz) la curăţirea locului.

21. La sfârşitului lucrului în laborator se vor spăla mâinile cu apă şi săpun.

22. În afară de aceste măsuri, se vor avea în vedere toate cele necesare evitării oricărui risc care ar putea rezulta în urma utilizării unor substanţe caustice, manipulării diferitelor aparate electrice etc.

În ceea ce priveşte utilizarea cabinetelor de siguranţă biologică (hote, boxe, nişe), vor fi prezentate unele noţiuni în capitolul al 3-lea.

Respectarea acestor norme de protecţie este strict necesară.

Trebuie să avem în vedere şi faptul că recomandările şi directivele Uniunii Europene în domeniul biosecurităţii trebuie să fie adoptate de către ţara noastră; după integrarea României în EU respectarea acestora va deveni obligatorie.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. DATE PRIVIND ECHIPAMENTUL ŞI APARATURA UTILIZATE ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

În diferitele încăperi (spaţii) ale laboratorului de microbiologie putem întâlni o serie de echipamente, elemente de birotică, diferite aparate.

Spre exemplu, în încăperea unde are loc recepţionarea produselor patologice trebuie să existe registre sau un sistem computerizat de înregistrare a datelor (**înregistrarea corectă** a datelor în sistemul sanitar trebuie să reprezinte o **prioritate** pentru oricare dintre unităţile medicale indiferent de sistemul public sau privat), stative pentru tuburi, eprubete, flacoane etc, un incubator la 37°C, un frigider etc. În locul unde se desfăşoară diagnosticul microbiologic trebuie să existe la îndemână anse bacteriologice, diferite pipete, pense, baghete de lemn, tampoane de diferite dimensiuni, becul Bunsen, microscopul, lupa, lame şi lamele, truse de colorare, centrifuga, balanţa, baia de apă, un incubator, un frigider, plăci Petri, eprubete, containere pentru materialul contaminat, cabinetul de siguranţă biologică etc.

În cele ce urmează vor fi enumerate o parte dintre ustensilele şi aparatele care se pot găsi în laboratorul de microbiologie.

1. Microscoape, lupe şi truse de coloranţi:

- microscop optic (câmp luminos);

- alte tipuri de microscop, care pot fi utilizate în cameră obscură (microscop cu fond întunecat, microscop cu contrast de fază, microscop cu fluorescenţă) în situaţii particulare de diagnostic;

- truse pentru coloraţii uzuale (albastru de metilen, Gram, Ziehl-Neelsen etc) şi speciale;

- lupă de mână şi lupă stereoscopică (pentru studierea morfologiei coloniilor).

2. Cabinete de siguranţă biologică (incinte, boxe, nişe):

- cabinetul de clasă I, în care aerul curat antrenează aerosolii produşi dinspre persoana care lucrează şi care se află în laborator către mediul exterior, printr-un filtru care reţine majoritatea particulelor periculoase;

- cabinetul de clasă II, în care aerul curat pătrunde filtrat, este recirculat prin filtre astfel încât suprafaţa de lucru vine în contact cu aer steril; în boxă nu se vor introduce surse de căldură;

- cabinetul de clasă III este complet închis; medicul îşi introduce mâinile în zona de lucru prin mănuşi fixate etanş la aparat; aerul este atât admis cât şi evacuat prin filtre;

3. Termostate şi băi de apă sau de nisip:

- termostate reglate la diferite temperaturi, în funcţie de profilul laboratorului şi a germenilor studiaţi (ex. 35-37°C pentru bacterii, 28°C pentru fungi etc);

- camere termostat;

- băi de apă de diferite mărimi (ex. pentru decomplementarea serurilor la 56°C);

- băi de nisip (ex. pentru coagularea unor medii de cultură/Loeffler etc).

4. Frigidere:

- frigidere de diferite dimensiuni, cu temperatura interioară de + 4°C/este de preferat utilizarea unui frigider separat de congelator, deoarece frigiderul se deschide mai frecvent şi aceasta va influenţa temperatura din compartimentul congelator;

- camere frigorifice;

- congelatoare de - 20°C şi de - 70°C (pentru anumite laboratoare specializate);

5. Centrifugi şi balanţe:

- în mod curent sunt utilizate centrifugi cu viteza de 3000 × g, preferabil cu rotor orizontal (pentru diminuarea cantităţii de aerosoli); în apropierea centrifugii se va plasa o balanţă, pentru echilibrarea tuburilor;

- centrifugi cu viteze superioare, în laboratoare specializate (ex. mycobacteriologie);

- centrifugi cu viteze superioare şi sistem de răcire (ex. biologie moleculară);

- balanţe tehnice (pentru medii de cultură, reactivi, soluţii în volume mari);

- balanţe farmaceutice (pentru soluţii de coloranţi, alte soluţii în volume mici);

- balanţă analitică (pentru reactivi în cantităţi foarte mici);

- balanţă electronică (pentru biologie moleculară).

6. Mojare, agitatoare, dispozitive de triturare a ţesuturilor.

7. Aparate pentru distilarea şi demineralizarea apei.

8. Aparate pentru stabilirea pH-ului.

9. Fotometre sau colorimetre

10. Distribuitoare pentru medii de cultură.

11. Aparate şi dispozitive pentru sterilizare şi dezinfecţie:

- incinerator (de regulă, în vederea incinerării se încheie un contract de prestări servicii cu o firmă de profil);

- etuvă (pupinel, cuptor Pasteur);

- autoclav;

- filtre de diferite tipuri;

- lămpi cu UV etc.

12. Containere pentru materialul contaminat:

- găleţi de metal cu capac;

- saci din material plastic;

- saci rezistenţi la temperaturile atinse în autoclav;

- borcane cu soluţii dezinfectante etc.

13. Inventar de sticlărie:

- eprubete de diferite dimensiuni (ex. 12/120 mm, 16/160 mm);

- tuburi de centrifugă;

- ţeavă de sticlă pentru confecţionarea de pipete Pasteur;

BCU "V. ŞTEFĂRUŢĂ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- pipete gradate de diferite dimensiuni;
- baghete de sticlă;
- baloane;
- flacoane (ex. Erlenmeyer);
- pahare (ex. Berzelius);
- exsicatoare;
- cilindrii gradaţi de diferite dimensiuni;
- plăci Petri;
- lame şi lamele pentru microscopie etc.

14. Inventar de material plastic şi cauciuc:

- dispozitive adaptate la pipete pentru a elimina pipetarea cu gura;
- tuburi de centrifugă;
- containere pentru produsele patologice;
- plăci Petri;
- anse calibrate etc.

15. Alte articole de laborator: trepiede, stelaje de lemn sau metal, coşuri de sârmă, site de azbest, becuri Bunsen, casolete, foarfeci, bisturie, pense, sonde, seringi, anse bacteriologice (cu buclă, anse-fir, din platină sau nichelină), tampoane diferite, tije cu tampon şi alte instrumente pentru recoltarea produselor patologice, termometre etc.

Fără a încerca să menţionăm toate dispozitivele, echipamentele, aparatele întâlnite într-un laborator de microbiologie am considerat că această listare este utilă atât pentru medicul sau biologul care lucrează în laborator cât şi pentru viitorul medic, indiferent de specialitate.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. METODE DE DEZINFECȚIE ȘI STERILIZARE UTILIZATE ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

DEFINIȚII DE BAZĂ

Sterilizarea reprezintă distrugerea sau îndepărtarea tuturor microorganismelor patogene sau nepatogene, forme vegetative sau spori, de pe o suprafaţă sau dintr-un mediu (lichid sau solid).

Septic înseamnă contaminat cu microbi patogeni sau infectat (de exemplu infecţia unei plăgi).

Aseptic înseamnă lipsit de microbi, indiferent dacă microbii sunt patogeni sau nepatogeni.

Asepsia reprezintă ansamblul de metode prin care evităm contaminarea mediului ambiant cu germeni microbieni sau prin care putem menţine "sterilitatea" ţesuturilor, mediilor de cultură, medicamentelor injectabile etc.

Dezinfecţia reprezintă distrugerea formelor vegetative microbiene (uneori şi a sporilor) din anumite medii (lichide, solide) sau de pe suprafeţe. Se realizează cu ajutorul unor agenţi fizici sau cu ajutorul substanţelor dezinfectante.

Antisepsia reprezintă înlăturarea sau distrugerea formelor vegetative microbiene de pe tegumente, mucoase sau din plăgi. Se realizează cu ajutorul substanţelor antiseptice.

STERILIZAREA

Toate materialele utilizate în laboratorul de microbiologie trebuie să fie sterile înainte de utilizare. Există o mare diversitate de materiale care trebuie sterilizate, astfel încât şi metodele de sterilizare sunt destul de variate, după cum urmează:

1. Metode de sterilizare prin căldură
   - căldura uscată;
   - căldura umedă.
2. Metode de sterilizare prin filtrare
3. Metode de sterilizare utilizând radiaţiile
4. Metode chimice de sterilizare.

Metodele de sterilizare care utilizează radiaţiile (cu excepţia radiaţiilor ultraviolete) şi metodele chimice de sterilizare (ex. cu oxid de etilenă) sunt utilizate rareori în laboratorul de microbiologie.

Sterilizarea va fi întotdeauna precedată de pregătirea materialului care urmează să fie sterilizat:

- spălare, uscare, ambalare în cazul materialelor curate, necontaminate;
- autoclavare, spălare, uscare, ambalare/în cazul materialelor contaminate refolosibile.

Există o serie de metode pentru a controla eficienţa sterilizării, prin indicatorii fizici (ex. termometru), chimici (ex. floare de sulf, tiouree) sau biologici (ex. spori de *Bacillus stearothermophilus).*

BCU IAȘI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

Sterilizarea prin căldură uscată

Sterilizarea prin căldură uscată are ca mecanism oxidarea sau carbonizarea structurilor bacteriene.

1. Sterilizarea prin încălzire la **incandescenţă („la roşu")** reprezintă introducerea şi menţinerea în flacăra becului Bunsen până la înroşire, pe toată lungimea, a obiectului care urmează a fi sterilizat. Se poate aplica pentru ansa bacteriologică (cu buclă sau fir) sau pentru spatulă.

Flambarea reprezintă trecerea prin flacără (de câteva ori) a unui obiect, fără a se atinge temperatura de incandescenţă. Flambarea se aplică pentru portansă, gâtul unui recipient de sticlă (tub, eprubetă, flacon etc) sau pentru capilarul pipetelor Pasteur.

2. Sterilizarea **cu aer cald** se realizează în etuvă (pupinel, cuptor Pasteur). Etuva este o cutie metalică cu pereţi dubli. Cu ajutorul unor rezistenţe electrice şi a unui termostat se obţine şi menţine temperatura pentru sterilizare. Uniformizarea temperaturii în interiorul aparatului este realizată cu ajutorul unui sistem de ventilaţie.

Pentru majoritatea materialelor care urmează a fi sterilizate, temperatura din etuvă trebuie să atingă 180°C, pentru o durată de 1 oră. În unele situaţii timpul de sterilizare poate depăşi 60 de minute (ex. pentru ambalaje de dimensiuni mari).

Sterilizarea cu aer cald este indicată pentru obiecte de sticlă, obiecte de porţelan, pulberi inerte şi termostabile, uleiuri anhidre, instrumentar chirurgical (pentru instrumentarul metalic este de menţionat faptul că repetarea sterilizării, în timp, conduce la decălirea oţelului) etc. Nu se vor steriliza în etuvă soluţiile apoase, obiectele de plastic, obiectele de cauciuc, vată, bumbac, fibră sintetică, alte materiale termolabile, materiale contaminate din laborator.

3. **Incinerarea** reprezintă arderea până la obţinerea de cenuşă. Există anumite reguli stricte privind incinerarea, pentru a preveni diferitele tipuri de poluare.

În cazul spitalelor, de multe ori sunt prevăzute incineratoare în structura unităţii sanitare respective. De regulă, în vederea incinerării se încheie un contract de prestări servicii cu o firmă de profil. Din punctul de vedere al laboratorului de microbiologie ar putea fi supuse incinerării materiale de unică folosinţă din plastic, reziduuri organice solide, gunoi, cadavrele animalelor de experienţă etc.

Sterilizarea prin căldură umedă

Sterilizarea prin căldură umedă este cea mai eficientă metodă de sterilizare şi are ca mecanism coagularea proteinelor şi degradarea enzimelor.

1. **Autoclavarea** este esenţială atât pentru laboratoarele de microbiologie, cât şi pentru unităţile sanitare în general, indiferent de sistemul public sau privat. Vaporii de apă realizează la 0,5 atmosfere o temperatură de 115°C, la 1 atmosferă o temperatură de 121°C şi respectiv 134°C la 2 atmosfere.

Autoclavul are ca piesă principală un cazan cu pereţi metalici, care se închide etanş cu un capac prevăzut cu un sistem special de închidere şi în interiorul căruia, vaporii de apă sunt comprimaţi la presiunea necesară în vederea sterilizării. Există mai multe tipuri de autoclave:

- autoclave cu perete simplu;
  - verticale;
  - orizontale;

- autoclave cu manta de aburi;
  - verticale;
  - orizontale.

În continuare, drept exemplu, vom discuta numai despre autoclavul cu perete simplu, vertical, la care vaporii provin din apa aflată în cazanul de presiune şi ajung în camera de sterilizare de jos în sus. Presiunea din interiorul cazanului este înregistrată de un manometru. Pentru punerea în funcţiune a autoclavului, în dotare există 2 robinete: unul superior (robinetul de aer şi vapori, care permite legătura între cazan şi mediul exterior) şi unul inferior (robinetul care permite evacuarea apei din cazan). Pentru a evita accidentele există o supapă de siguranţă care se deschide şi permite evacuarea vaporilor atunci când, accidental, presiunea vaporilor depăşeşte limita de siguranţă. În momentul de faţă pentru evitarea riscului de a veni în contact cu vapori de apă fierbinţi aflaţi sub presiune, autoclavele sunt dotate cu un sistem care nu permite deschiderea capacului până când presiunea din interior nu o egalizează pe cea din exterior. Cazanul de presiune este inclus într-un perete exterior solid care la partea inferioară are un spaţiu în care se află sursa de căldură.

În partea inferioară a cazanului de presiune se află un suport pe care se aşează o placă de metal perforată. Pe suport se aşează materialele care trebuie sterilizate iar faptul că placa este perforată permite trecerea vaporilor de apă produşi după încălzirea apei. În vederea sterilizării se procedează astfel:

- verificăm nivelul apei din partea inferioară a cazanului, care trebuie să fie până la o distanţă de 2-3 centimetri de suport; dacă nivelul a scăzut, se completează (recomandabil se va utiliza apă distilată);
- aşezăm pe suport obiectele şi materialele de sterilizat, ambalate corespunzător
- închidem etanş capacul, folosind sistemul special de etanşeizare cu care este dotat autoclavul pe care îl avem la dispoziţie;
- conectăm sursa de căldură;
- deschidem robinetul pentru evacuarea aerului şi vaporilor (dacă rămâne aer în cazanul cu presiune eficienţa sterilizării va scădea considerabil; vaporii de apă fiind mai uşori, vor încălzi în special partea superioară a cazanului în timp ce aerul, care va atinge temperaturi inferioare, fiind mai greu, va rămâne în partea inferioară a cazanului);
- închidem robinetul după evacuarea aerului şi apariţia unui jet continuu de vapori;
- presiunea din cazan începe să crească şi este urmărită cu ajutorul manometrului; atunci când presiunea atinge valoarea dorită (de ex. 1 atmosferă), reglăm sursa de căldură în aşa fel încât această presiune să fie menţinută pentru toată durata sterilizării (de ex. 30 minute);
- după trecerea celor 30 minute întrerupem sursa de căldură şi lăsăm autoclavul să se răcească până când presiunea din interior ajunge la nivelul presiunii atmosferice;
- deschidem lent robinetul de vapori;
- deschidem sistemul de etanşeizare şi capacul autoclavului;
- lăsăm obiectele şi materialele să se răcească în autoclavul deschis;
- atunci când temperatura ajunge la circa 80°C putem scoate materialele sterilizate.

Prin autoclavare putem steriliza diferite substanţe în soluţie, sticlărie (cu excepţia pipetelor şi lamelor), materiale contaminate din laborator, instrumentar chirurgical (metalic, de cauciuc sau bumbac), medii de cultură, aparate de filtrat etc.

2. **Tindalizarea** (sterilizarea fracţionată) este o metodă de sterilizare prin căldură umedă care evită depăşirea unei temperaturi de 100°C. Substanţele de sterilizat se menţin la 56-100°C timp de 30-60 minute, 3 până la 8 zile succesiv. Astfel, utilizând medii care permit germinarea, după prima încălzire timp de 30-60 minute sunt distruse formele vegetative iar după răcire are loc germinarea sporilor. În ziua următoare sunt distruse prin încălzire formele vegetative rezultate din germinarea sporilor iar după răcire are loc germinarea sporilor care nu au germinat în prima zi etc.

Din punct de vedere tehnic pot fi utilizate autoclave la care se va menţine permanent deschis robinetul de vapori (şi astfel nu se va depăşi în interior temperatura de 100°C), băi de apă sau băi de nisip.

Prin tindalizare se pot steriliza alimente, unele medii de cultură etc.

Pasteurizarea şi **fierberea** nu reprezintă metode de sterilizare, dar sunt utilizate în anumite situaţii. **Pasteurizarea** foloseşte căldura umedă şi are aplicaţii în conservarea pentru scurtă durată a unor alimente (lapte, bere etc). Există o pasteurizare joasă (30 minute la 56-65°C), o pasteurizare medie (15 minute la 65-75°C) şi o pasteurizare înaltă (2-5 minute la 85-90°C). Prin pasteurizare sunt distruse bacteriile în formă vegetativă dar nu şi sporii. **Fierberea** poate fi utilizată atunci când nu dispunem de alte metode eficiente de sterilizare. Fierberea timp de 30 minute distruge bacteriile în formă vegetativă, fungii şi virusurile, dar nu şi sporii bacterieni. Timpul se înregistrează după ce apa a început să fiarbă. Eficienţa acestei metode poate fi crescută prin adăugarea de carbonat de sodiu 1-2%.

Sterilizarea prin filtrare

Microorganismele pot fi reţinute mecanic şi electrostatic în porii unui filtru. Trecerea unui lichid printr-o substanţă prevăzută cu pori care va reţine microorganismele din lichidul respectiv poartă numele de **sterilizare prin filtrare.**

De-a lungul timpului au fost utilizate o serie de filtre clasice (porţelan, sticlă poroasă, azbest impregnat cu caolin, pământ de infuzori). Actualmente se folosesc din ce în ce mai frecvent membrane filtrante din acetat de celuloză cu porozităţi între 8 şi 0,025 m. În vederea filtrării sunt necesare o serie de piese precum: un recipient în care se introduce lichidul care urmează a fi filtrat, un recipient în care se va colecta lichidul sterilizat, o pâlnie care se montează etanş între cele 2 recipiente, o pompă de vid care va aspira lichidul din primul în al doilea recipient, prin membrana filtrantă. Toate aceste piese sunt sterilizate prin autoclavare înainte de începerea filtrării.

Există şi alte variante tehnice. Cu o importanţă practică particulară ar fi de menţionat filtrele pentru sterilizarea aerului din cabinetele de siguranţă biologică (clasa II şi clasa III), filtrele HEPA (High Efficiency Particulate Air Filters).

Sterilizarea prin filtrare este utilizată pentru decontaminarea aerului, a unor medii de cultură (care nu se pot steriliza prin autoclavare), a unor reactivi care sunt sensibili la temperaturile atinse în cazul sterilizării prin căldură etc.

Sterilizarea prin intermediul radiaţiilor

Radiaţiile neionizante (UV) sau ionizante (X etc) au efecte bactericide prin ruperea legăturilor de hidrogen, oxidarea legăturilor duble etc.

Radiaţiile UV sunt utile în sterilizarea suprafeţelor de lucru (pentru repartizarea mediilor de cultură, alte manevre aseptice etc) în cazul în care nu există cabinete de siguranţă biologică cu flux laminar. Lămpile cu UV sunt numite lămpi germicide.

Radiaţiile ionizante se pot utiliza în sterilizări industriale (pentru alimente, medicamente, seringi de unică întrebuinţare etc).

Antisepsia şi Dezinfecţia

Antisepticele şi dezinfectantele sunt substanţe cu acţiune antimicrobiană neselectivă, alterând structuri şi funcţii comune microorganismelor şi organismelor superioare. Antisepticele pot fi utilizate pe tegumente şi mucoase, dezinfectantele pot fi utilizate numai pe suprafeţe şi structuri care nu sunt vii.

Clasificare în funcţie de mecanismul de acţiune

a). Substanţe care denaturează proteinele (au în general efect bactericid): acizii, bazele, alcoolii (de exemplu alcoolul etilic de 70°, folosit pentru antiseptizarea tegumentelor).

b). Substanţe care oxidează grupările chimice libere ale enzimelor (de exemplu, SH): hipermanganatul de potasiu 1‰, util în antiseptizarea mucoaselor, peroxidul de hidrogen, soluţie 3% în apă, utilizat în antiseptizarea plăgilor, halogenii (Cl_2, I_2, Br_2) şi derivaţii lor (hipocloriţi, cloramine, soluţii iodurate etc) în concentraţii corespunzătoare etc.

c). Substanţe care blochează grupările chimice libere ale enzimelor (de exemplu, SH): metale grele sărurile de mercur, preparatele organomercuriale (exemplu merthiolat de sodiu), sărurile de argint, compuşi de argint coloidal (exemplu colargol, protargol) cu efecte bactericide, grupările alchil ale formaldehidei, glutaraldehidei, oxidului de etilen etc.

d). Substanţe care lezează membranele celulare: ex. fenolii; acidul fenic are utilizări limitate datorită proprietăţilor caustice şi toxicităţii sale; este etalonul faţă de care se măsoară activitatea antimicrobiană a antisepticelor şi dezinfectantelor (indicele fenolic), crezolii, hexaclorofenul, clorhexidina (cu efecte toxice mai reduse) etc, detergenţii anionici (săpunuri, perlan etc), cationici (săruri cuaternare de amoniu, de exemplu bromocet), amfolitici (de exemplu acidul dodecilaminoacetic), neionici (de exemplu propilenglicolul).

e). Substanţe care alterează acizii nucleici: coloranţii bazici (violet de genţiană, albastru de metilen, fucsină bazică etc), derivaţii de acridină, de exemplu rivanolul.

În continuare vom prezenta pe scurt câteva dintre substanţele dezinfectante, ţinând cont de faptul că nu există nici un dezinfectant ideal. Există numeroase substanţe şi numeroşi producători de antiseptice şi dezinfectante.

Hipocloriţii:

- soluţiile de hipoclorit se prepară periodic (se inactivează după mai mult de 24 ore);
- concentraţia în clor activ este diferită în funcţie de scopul urmărit (ex. 2.500 ppm clor activ pentru dezinfectarea pipetelor contaminate);
- au efect dezinfectant asupra bacteriilor în formă vegetativă, sporilor bacterieni, fungilor (100 ppm în o oră), virusurilor (200 ppm în 10 minute);
- efectul este diminuat considerabil în prezenţa substanţelor organice (în special proteine), maselor plastice, detergenţilor.

Derivaţii fenolici:

- datorită toxicităţii, potenţialului carcinogenetic şi corozivităţii, fenolii nu se folosesc ca atare, ci sub forma derivaţilor fenolici;
- soluţiile fenolice se prepară periodic (pentru cel mult 24 ore);
- concentraţia poate fi diferită în funcţie de scopul urmărit (de obicei este de 2-5%);
- au efect dezinfectant asupra bacteriilor în formă vegetativă, fungilor, unor virusuri (ex. HIV e inactivat de soluţia 0,5%);
- efectul este diminuat pe suprafeţele de cauciuc, lemn sau material plastic.

Glutaraldehida:

- cel mai frecvent este utilizată concentraţia de 2%, la un pH alcalin;
- are efect dezinfectant asupra bacteriilor în formă vegetativă (în cazul mycobacteriilor este necesar un timp mai lung de expunere), fungilor, virusurilor;
- datorită faptului că nu corodează metalele (aşa cum se întâmplă în cazul substanţelor prezentate mai sus) se poate folosi şi la dezinfectarea suprafeţelor metalice;
- nu poate fi folosită pentru suprafeţe, datorită vaporilor iritanţi şi timpului mare de expunere; ideală pentru dezinfectarea echipamentelor contaminate ce pot fi imersate o perioada mai mare de timp în containere menţinute închise.

Iodoforii:

- sunt substanţe care complexează iodul pe care îl eliberează în soluţii apoase;
- au efect dezinfectant asupra bacteriilor în formă vegetativă, unor spori bacterieni, fungilor, unor virusuri (ex. virusuri cu înveliş lipidic);
- sunt inactivaţi de substanţe organice (în special proteice), mase plastice, detergenţi;
- pot fi utilizaţi pentru dezinfecţia suprafeţelor, dezinfecţia pipetelor contaminate.

Sterilizarea cu etilenoxid (CH_2CH_2O):

- exercită activităţi bactericide prin alkilarea acizilor nucleici şi prin înlocuirea hidrogenului labil printr-o grupare hidroxietil ($-CH_2CH_2OH$);
- sporii de *Bacillus subtilis* nu sunt distruşi;
- acest tip de sterilizare se utilizează pentru materiale care nu rezistă atunci când sunt supuse acţiunii temperaturii sau radiaţiilor (ex. materiale din cauciuc, plastic, echipament electronic etc);
- etilenoxidul poate exploda; variantele pentru evitarea exploziei includ: 1. utilizarea etilenoxidului în camere speciale care permit menţinerea unei presiuni negative 2. combinarea cu CO_2 în camere de oţel speciale 3. combinarea cu hidrocarburi fluorinate;
- indiferent de varianta folosită trebuie respectate toate recomandările producătorului;
- există o serie de inconveniente în ceea ce priveşte acest tip de sterilizare (efecte carcinogenetice, efecte la nivelul sistemului nervos etc);
- sterilizarea este în principiu influenţată de: concentraţia etilenoxidului, temperatură, umiditatea relativă şi timpul de expunere (spre ex. o dublare a concentraţiei va reduce la jumătate timpul necesar pentru sterilizare).

5. SCHEMA GENERALĂ A DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR MICROBIOLOGIC

Diagnosticul de laborator în microbiologie poate fi un diagnostic bacteriologic sau micologic (direct), un diagnostic imunologic (indirect) sau o combinaţie a celor două variante menţionate.

În continuare vor fi prezentate succint principalele etape ale diagnosticului microbiologic, pe o schemă care va fi urmată pe parcursul următoarelor capitole. Fiecare dintre etape va fi tratată din punct de vedere practic, constituind un îndrumar al activităţii din cursul lucrărilor practice dar şi un suport pentru reţinerea acestor noţiuni din punct de vedere teoretic.

Astfel, începând cu normele privind prelevarea şi transportul probelor, continuând cu prepararea frotiurilor şi coloraţiilor, tehnica examenului microscopic, prezentarea principalelor medii de cultură şi a tehnicilor de cultivare, după prezentarea metodelor de identificare, partea „generală" se va încheia cu testarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice.

În partea de „imunologie", după o discuţie succintă a noţiunilor de antigen, anticorp şi a reacţiilor antigen-anticorp, vor fi prezentate succesiv reacţiile de precipitare, aglutinare, de fixare a complementului, seroneutralizarea, reacţiile în care reactanţii sunt marcaţi precum şi utilizarea unor metode moderne în testarea imunităţii.

Capitolul 22 va fi dedicat preparatelor biologice pentru uz uman.

A. Diagnosticul de laborator bacteriologic/micologic

Diagnosticul de laborator bacteriologic/micologic are mai multe etape, şi anume:

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic (se va face cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să i se fi administrat antibiotice sau chimioterapice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie, prelevând un anumit produs patologic în funcţie de manifestarea clinică în cazul respectiv, de exemplu urină în cazul unei infecţii urinare, materii fecale în cazul unei boli diareice, lichid cefalo-rahidian în cazul suspiciunii unei meningite, scuame în cazul unei micoze cutanate superficiale etc).

2a. Examinarea macroscopică a produsului patologic poate fi uneori foarte utilă (ex. puroiul colorat albastru sau albastru verzui este sugestiv pentru o infecţie cu *Pseudomonas aeruginosa* etc).

2b. Examinarea microscopică a produsului patologic reprezintă de multe ori o etapă esenţială şi poate orienta paşii următori. Se vor realiza minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Este de preferat să avem întotdeauna cel puţin încă un frotiu de rezervă, mai ales în cazul în care produsul patologic este „preţios" (LCR, produs recoltat prin puncţie-biopsie etc). în cazul suspicionării unei infecţii mycobacteriene este necesară realizarea unui frotiu suplimentar, care se va colora Ziehl-Neelsen. Frotiurile se examinează

la microscopul optic cu imersie şi se notează prezenţa diferitelor celule (eventual modificate faţă de normal), prezenţa celulelor inflamatorii (dovada reacţiei organismului faţă de infecţie, ex. leucocite polimorfonucleare neutrofile), precum şi eventuala prezenţă a microbilor, care va fi interpretată cu precauţie, în contextul dat.

Atunci când produsul recoltat este reprezentat de sânge, urină sau materii fecale, de regulă nu se realizează frotiuri fixate şi colorate. Spre exemplu, în cazul materiilor fecale, se va face o coprocitogramă, un preparat proaspăt între lamă şi lamelă, căutându-se în special prezenţa leucocitelor (dar şi a unor structuri care pot da anumite informaţii cu privire la funcţionalitatea tractului digestiv). În cazul suspicionării unei infecţii urinare, se va obţine un sediment urinar (după centrifugarea urinei), care se va examina între lamă şi lamelă în vederea aprecierii prezenţei şi eventual a numărului de leucocite prezente pe câmp, precum şi a altor celule normale sau patologice, date care pot fi deosebit de utile în vederea unui diagnostic corespunzător.

În cazul suspiciunii unei infecţii micotice sunt utile atât preparatele proaspete (de ex. preparatul umed montat în soluţie de KOH-glicerol 10-20%), frotiurile cu coloraţii negative (tuş de India, nigrozină) precum şi frotiurile colorate May-Grünwald-Giemsa sau Gram.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se va face în funcţie de situaţie (mediile şi condiţiile de incubare se vor alege în funcţie de presupusul microorganism pe care dorim să-l izolăm). Cultivarea se va realiza în aşa fel încât să se poată obţine colonii izolate şi respectiv o cultură pură, care se va identifica.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

a) caractere morfologice (se va face un frotiu din colonia izolată, frotiu care se va colora Gram sau Ziehl-Neelsen, după caz, şi se va examina microscopic. În această situaţie se vor evidenţia numai microorganisme care au formă şi tinctorialitate similară);

b) caractere de cultură (se vor examina coloniile izolate apărute pe mediile de cultură solide şi care pot fi de tip S pentru majoritatea bacteriilor studiate, de tip R în cazul *Corynebacterium diphteriae, Mycobacterium tuberculosis* şi *Bacillus anthracis* şi respectiv de tip M în cazul bacteriilor capsulate, de exemplu *Klebsiella pneumoniae* sau alte caractere în cazul fungilor);

c) caractere biochimice, care pot fi foarte variate de la o specie de microbi la alta şi care pot fi foarte utile spre exemplu în cazul diferenţierii enterobacteriilor (mediile multitest), fungilor (auxanograma) etc;

d) caractere antigenice care vor fi examinate bazându-ne pe structura microorganismelor şi pe specificitatea reacţiilor antigen-anticorp, utilizând **anticorpi cunoscuţi** pentru a identifica antigenele microbiene necunoscute; spre exemplu, prin reacţii de aglutinare pe lamă se vor identifica antigenele genului *Shigella, Vibrio* etc; există anticorpi specifici polivalenţi sau monovalenţi care vor fi utilizaţi de la caz la caz;

e) caractere de patogenitate, atunci când se vor examina spre exemplu capacitatea unui microorganism de a elabora anumite substanţe cu rol în patogenitate (exemplu coagulaza produsă de *S. aureus)* sau infecţia experimentală la animalul de laborator (de exemplu, izolarea pneumococilor de la un pacient cu pneumonie după inocularea sputei la şoarecele alb;

în cazul în care în spută există pneumococi, animalul va muri în 24-48 de ore, iar din sângele lui se va izola o „cultură pură" de pneumococi);

f) lizotipie (sensibilitatea la un anumit bacteriofag specific);

g) caractere genetice care vor fi „examinate" prin tehnici de biologie moleculară;

h) alte caractere utile în identificarea microorganismelor (bacterii, fungi).

5. Antibiograma şi respectiv antifungigrama (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice anti-bacteriene sau anti-fungice, în vederea stabilirii tratamentului) se va realiza de obicei prin metode difuzimetrice, dar în cazul unor infecţii grave trebuie să fie însoţită de alte determinări. Spre exemplu pot fi necesare în cazul infecţiilor bacteriene determinarea concentraţiilor minime inhibitorii (CMI) şi respectiv bactericide (CMB). În anumite situaţii poate deveni necesară determinarea nivelului de eficienţă pentru antibioticul utilizat, respectiv nivelul de eficienţă inhibitorie (NEI) şi nivelul de eficienţă bactericidă (NEB). Există şi metode moderne pentru determinarea sensibilităţii la antibiotice (ex. E test, metode care utilizează tehnici de biologie moleculară etc).

B. Diagnosticul de laborator imunologic (serologic şi/sau imunobiologic)

B.1. În cadrul diagnosticului de laborator serologic se va determina prezenţa (sau se va dovedi absenţa) anticorpilor necunoscuţi, în serul pacientului respectiv, utilizând **antigene cunoscute.** În diagnosticul serologic ne bazăm pe specificitatea reacţiilor antigen-anticorp şi utilizând diferite tehnici trebuie să putem răspunde la minim trei întrebări esenţiale, şi anume:

- există anticorpi în serul pacientului investigat?

- care este titrul anticorpilor?

- cum evoluează în dinamică (în timp) acest titru, motiv pentru care se vor realiza minim două determinări diferite la un interval de 7-10 zile (pentru majoritatea infecţiilor care pot fi diagnosticate astfel); această analiză ne va permite să diferenţiem situaţia unei afecţiuni acute (titrul anticorpilor este mai crescut la a doua determinare, în mod clasic de 4 ori), de situaţia în care pacientul este deja în convalescenţă (titrul anticorpilor la a doua determinare va fi mai scăzut) sau de situaţia unui pacient cu o afecţiune cronică (titrul anticorpilor va fi asemănător sau foarte apropiat la cele două determinări succesive). În vederea identificării unei infecţii acute, o altă variantă de lucru ar fi determinarea anticorpilor specifici de tip IgM.

B.2. În cadrul diagnosticului de laborator imunobiologic se va studia de exemplu reactivitatea pacientului faţă de un anumit antigen inoculat. Intradermoreacţia la tuberculină (PPD, derivat proteic purificat) sau la candidină, reprezintă exemple clasice în acest sens. Tehnica intradermoreacţiei este folosită în mai multe scopuri şi trebuie să avem în vedere că în funcţie de scopul urmărit şi respectiv în funcţie de antigenul inoculat (şi de mecanismul implicat), modul de citire al rezultatelor va fi diferit.

*

* *

Aşa cum am menţionat mai sus, această „schemă" de diagnostic este utilă şi este bine să fie reţinută şi aplicată pentru fiecare infecţie în parte. Fiecare dintre capitolele care urmează îşi găsesc locul într-un anume punct al schemei generale.

Iniţial vor fi studiate din punct de vedere practic noţiunile de bază (microbiologie generală şi imunologie) pentru ca în ultima parte să trecem la studierea diagnosticului ca atare, în cursul microbiologiei speciale, urmărind maladiile produse de principalele microorganisme.

Considerăm că pentru orice medic, indiferent de specialitatea aleasă, multe dintre principiile de bază ale microbiologiei sunt foarte utile, merită a fi înţelese şi aplicate corespunzător. Pentru cei care se dedică microbiologiei, aceste noţiuni reprezintă o bază care poate fi completată utilizând diferitele tratate medicale în domeniu dar şi experienţa personală dezvoltată atât din punct de vedere teoretic cât şi practic.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. NORME PRIVIND PRELEVAREA ŞI TRANSPORTUL PRODUSELOR PATOLOGICE ÎN DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC DIRECT

În schema generală a diagnosticului microbiologic direct, fie că diagnosticul se adresează unei infecţii bacteriene, fie uneia fungice, recoltarea (prelevarea) şi transportul produsului patologic reprezintă o etapă esenţială. De altfel această afirmaţie este perfect valabilă şi în diagnosticul virusologic sau parazitologic. Utilizăm termenul de „produs patologic" în relativ exces, adică de regulă recoltăm un anumit produs care este potenţial patologic; faptul că este patologic îl vom dovedi (sau infirma) în cursul diagnosticului de laborator. Pentru a simplifica modul de exprimare, vom accepta utilizarea acestor termeni ca atare.

Prelevarea şi transportul produsului patologic (p.p.) efectuate corespunzător va permite realizarea etapelor următoare de diagnostic, culminând cu stabilirea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice a microorganismului **implicat patogenic** în **infecţia dovedită** la **un pacient anume** („nu există boli, ci bolnavi").

Reguli privind recoltarea produselor patologice

Se cunosc o serie de reguli care trebuie respectate cu stricteţe în cursul acestei etape:

- este recomandabil ca recoltarea şi stabilirea modalităţii de transport a p.p. să fie făcută de medic sau sub îndrumarea unui medic de specialitate;
- prelevarea p.p. trebuie să aibă loc **înainte** ca pacientul să fi primit antibiotice sau chimioterapice;
  - acest deziderat este îndeplit din ce în ce mai rar ceea ce crează multe probleme în diagnosticul microbiologic „contribuind" şi la selectarea microorganismelor rezistente la medicamentele antimicrobiene;
  - eforturile privind îndeplinirea lui trebuie să aparţină atât pacientului cât şi medicilor implicaţi (medic de familie, medic de altă specialitate);
  - chiar dacă boala este gravă iar tratamentul antibiotic „pare" urgent, trebuie reţinut că pentru recoltarea p.p. care poate duce la un diagnostic care ar putea salva viaţa pacientului sunt necesare numai câteva minute; după recoltarea p.p. se poate administra prima doză de antibiotic sau chimioterapic, ales „empiric", pe criterii de probabilitate;
  - în cazul în care evoluţia sub tratament antibiotic este nefavorabilă, diagnosticul microbiologic va permite (între timp) izolarea agentului etiologic şi stabilirea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice astfel încât „schimbarea" tratamentului se va putea face în mod riguros, ştiinţific;
  - alternativele sunt reprezentate de „schimbarea" tratamentului în mod mai puţin raţional sau chiar iraţional, cu posibile urmări nefaste pentru pacient sau apelarea la „cocteil-ul" (asocieri) de antibiotice cu riscurile de rigoare.
- în cazul în care (dintr-un motiv sau altul) tratamentul cu antibiotice a fost început înainte de prezentarea la spital/laborator, în funcţie de boala suspectată se pot recomanda următoarele abordări:

- oprirea, dacă este posibil, tratamentului pentru 24 - 48 ore, cu recoltarea p.p. şi începerea diagnosticului microbiologic;
- recoltarea p.p. imediat înainte de următoarea doză de antibiotic;
- încercarea de „antagonizare" a efectului antibioticului, în mediul de cultură (ex. cu sulfat de magneziu în cazul în care s-au administrat tetracicline);
- diluarea inoculului (mai ales dacă pacientul a primit un tratament bacteriostatic) în mediul de cultură fără antibiotic;
- notificarea în formularul în care se solicită analiza de laborator şi care însoţeşte p.p. precum şi în buletinul de analiză, a tuturor datelor privitoare la tratamentul primit de către pacientul investigat.

- recoltarea şi transportul p.p. trebuie să se realizeze cât mai aproape de debutul bolii, dar trebuie ales momentul cel mai potrivit (optim), respectiv momentul în care este cea mai mare probabilitate ca agentul etiologic să se găsească în produs
  - în funcţie de evoluţia bolii (de ex. coprocultura în febra tifoidă se va efectua „după" prima săptămână de evoluţie);
  - în funcţie de specificul fiziopatologic al bolii respective (de ex. se recomandă efectuarea hemoculturii în „accesul febril").
- produsul patologic din care estimăm că vom putea izola agentul etiologic al bolii suspicionate va fi ales în funcţie de maladie şi va putea fi reprezentat spre exemplu de
  - o secreţie de la nivelul presupusei porţi de intrare (ex. secreţie nazală sau faringiană în difterie, secreţie genitală în cazul unei boli veneriene etc);
  - un produs de la nivelul căilor de răspândire în organism (ex. sânge, ţesut recoltat prin biopsie de la nivelul ganglionilor limfatici);
  - un produs de la nivelul căilor de eliminare din organism (ex. urină în infecţiile tractului urinar, materii fecale într-o boală diareică acută etc);
  - un produs de la nivelul focarului infecţios (ex. lichid cefalo-rahidian/LCR în meningită, spută în pneumonie etc);
  - în vederea alegerii produsului care urmează a fi recoltat este necesară cunoaşterea patogeniei, evoluţiei şi elementelor clinice legate de bolile infecţioase, ceea ce este esenţial în cazul practicării cu adevărat a microbiologiei clinice.
- periodicitatea cu care se realizează recoltarea de p.p. poate influenţa rezultatul în anumite cazuri, spre exemplu
  - în suspicionarea unui sepsis (denumirea acceptată actual pentru septicemie); se recomandă recoltarea a 2-3 probe de sânge în 24 ore, pentru hemocultură;
  - în suspicionarea unei boli diareice acute se recomandă recoltarea a câte unei probe de materii fecale, trei zile consecutiv, pentru coprocultură;
  - în suspicionarea unei tuberculoze pulmonare se recomandă recoltarea a câte unei probe de spută, trei zile consecutiv etc.
- ceea ce a fost prelevat şi transmis pentru examinare trebuie să reprezinte cu adevărat p.p. (acel produs care conţine cu mare probabililtate microorganismul infectant), spre exemplu
  - în cazul în care este suspicionat diagnosticul de meningită şi a fost recoltat LCR, în cazul în care meningita este de etiologie bacteriană sau fungică, microorganismul implicat patogenic va putea fi identificat în cursul diagnosticului microbiologic;

BCU "VETERINARY LIBRARY"

- în schimb, dacă în cazul în care este suspicionată tuberculoza pulmonară se vor trimite spre examinare salivă sau secreţii de la nivelul arborelului respirator superior în loc de spută, diagnosticul microbiologic este imposibil etc.

- din p.p. se vor preleva şi utiliza în cursul diagnosticului microbiologic porţiunile cele mai reprezentative, respectiv acele porţiuni în care sunt cele mai mari şanse de identificare/vizualizare prin microscopie/cultivare şi izolare a microorganismului infectant, spre exemplu în cazul recoltării de materii fecale (suspiciune de boală diareică acută) se vor selecta porţiunile muco-purulente (eventual muco-sanguinolente)
- este necesar să se recolteze o cantitate de p.p. suficientă pentru efectuarea diagnosticului microbiologic (preparate proaspete, frotiuri, cultivări pe medii de cultură, inoculări la animale de experienţă, reluarea unor manevre în cazul că este necesar
- recoltarea şi transportul p.p. trebuie să se realizeze în condiţii stricte de asepsie, **pentru** prevenirea contaminării celui care recoltează, **pentru** prevenirea supra-infectării pacientului şi **pentru** prevenirea contaminării p.p.
  - se vor respecta precauţiunile universale privind prevenirea contaminării în unităţile sanitare;
  - se va evita, pe cât posibil, contaminarea p.p. cu microorganisme care aparţin florei microbiene normale (spre ex. prin tehnica de recoltare/vezi recoltarea urinei sau prin manevre invazive care şuntează căile naturale prin care sunt eliminate microorganismele/vezi recoltarea sputei prin lavaj bronhoalveolar);
  - se vor utiliza instrumente sterile şi recipiente (containere/recoltoare) sterile.

Regulile prezentate mai sus reprezintă elemente fundamentale în vederea obţinerii unui diagnostic corect şi, după opinia noastră, trebuie cunoscute de orice persoană implicată în actul medical, inclusiv de studenţii la medicină, chiar dacă nu vor alege pentru viitor pregătirea în domeniul medicinei de laborator sau în domeniul bolilor infecţioase.

Înainte de a încheia această parte a capitolului privind normele privind recoltarea şi transportul p.p. în diagnosticul microbiologic direct dorim să subliniem câteva aspecte care nu trebuie să fie neglijate, după cum urmează:

- instrumentele pentru recoltare trebuie să fie nu numai sterile dar şi adecvate, de ex. foarte frecvent este utilizat tamponul de vată, însă recoltarea cu tampon ar trebui să fie recomandată doar recoltării şi transportului p.p. = secreţie de la suprafaţa mucoaselor şi tegumentelor cu leziuni
  - vata poate conţine substanţe inhibitoare pentru microorganisme;
  - cantitatea de p.p. recoltabil este mică;
  - microorganismele şi leucocitele „rămân" în proporţie mare pe vată şi nu pot fi uşor transferate pe frotiu, mediu de cultură;
  - pentru anumite microorganisme (ex. *Bordetella pertussis)* utilizarea tamponului cu vată este total contraindicată;
- recipientele pentru recoltare şi transport trebuie să fie întâi curăţate (dar prin clătire să fie eliminate orice substanţe chimice cu posibil efect antimicrobian) şi apoi sterilizate, preferabil prin autoclavare; închiderea recipientelor trebuie să fie perfectă, pentru a preveni orice contaminare pe parcursul transportului;

- recipientele pentru recoltare şi transport trebuie să fie marcate corespunzător în aşa fel încât să nu fie posibilă apariţia unor confuzii; ceea ce se notează pe recipient trebuie să corespundă cu ceea ce a fost notat pe formularul de solicitare a respectivei analize;
- datele de identificare şi alte date semnificatice vor fi trecute în următoarele documente
  - registrul unităţii sanitare/secţiei/clinicii care solicită analiza respectivă (în cazul în care recoltarea produsului patologic se face în afara laboratorului);
  - formularul prin care se solicită analiza microbiologică;
  - registrul de lucru al laboratorului;
  - formularul prin care se anunţă rezultatul analizei (buletinul de analiză);
  - pentru simplificare, un singur formular poate include atât partea corespunzătoarea solicitării analizei cât şi buletinul de analiză microbiologică;
  - o altă modalitate de simplificare ar putea fi reprezentată de înregistrarea „electronică" a datelor şi utilizarea metodelor moderne de transmitere a lor; există doar câteva unităţi sanitare în România unde sunt utilizate aceste metode;
  - pentru reducerea cantităţii de date şi respectiv asigurarea confidenţialităţii, se recurge la „numărul unic de identificare", un grup de cifre şi litere care permit codificarea şi asocierea a câte unui astfel de număr fiecărui pacient în parte;
  - cu toate că înregistrarea datelor pare pentru majoritatea celor implicaţi în actul medical o „simplă" şi inutilă birocraţie, această modalitate de apreciere este complet eronată; înregistrarea datelor şi fluxul informaţiilor în sistemul sanitar sunt extrem de importante şi este necesar să fie depuse toate eforturile în vederea efectuării lor în mod corespunzător (din păcate orele de studiu dedicate acestor aspecte sunt mult prea reduse atât pe parcursul studenţiei cât şi în cursul rezidenţiatului).
- elemente importante care trebuie notificate atunci când se solicită o analiză de laborator microbiologică
  - pentru identificarea produsului patologic care urmează a fi prelucrat se vor nota numele, prenumele, vârsta pacientului (sau „numărul unic de identificare"), data şi locul recoltării (unitate sanitară, clinica, secţia, salonul);
  - pentru facilitarea alegerii celei mai potrivite modalităţi pentru prelucrarea p.p. se vor nota diagnosticul prezumtiv, natura p.p., examenul solicitat, data debutului bolii, ce medicaţie antimicrobiană a fost administrată respectivului pacient (antibiotic sau asociere de antibiotice, data începerii administrării, doze, durată);
  - în acelaşi sens se vor nota data şi ora recoltării, data şi ora recepţionării în laborator, cine şi cum a făcut recoltarea, cum a fost asigurat transportul p.p.;
  - subliniem faptul că, cel mai adesea venim în contact cu formulare incomplete/completate indescifrabil/completate cu erori şi chiar dacă ar putea părea incredibil, formulări de genul „nume X, prenume Y, probă Z, rugăm toată bateria de analize" sunt încă mult prea frecvente şi ar trebui ca de fiecare dată să conducă la o discuţie fermă cu „expeditorul" până când asemenea comportamente vor fi eliminate, în beneficiul pacienţilor.

Motive pentru care un p.p. ar putea fi respins de la analiza microbiologică

Respingerea p.p. ar trebui să reprezinte o excepţie în activitatea unui laborator de analize medicale, dar există anumite motive care pot conduce la această decizie. Înainte de a

prezenta câteva exemple în acest sens dorim să subliniem faptul că activitatea medicală se desfăşoară într-un sistem în care există mai multe verigi care trebuie să funcţioneze perfect (fiecare în parte) iar între verigile sistemului ar trebui să existe o perfectă colaborare.

În vederea stabilirii diagnosticului şi tratamentului corespunzător în cazul unui pacient care prezintă o anumită boală transmisibilă (infecţioasă) nu există o subordonare ci o corelare a activităţilor. Atât laboratorul cât şi clinica au de îndeplinit funcţii foarte importante, uneori decisive pentru viaţa pacientului.

Pentru ca în situaţiile „limită" funcţionarea să fie perfectă este necesar un continuu antrenament atât din punct de vedere teoretic şi tehnic dar şi în ceea ce priveşte colaborarea dintre parteneri. Respingerea unui p.p. şi solicitarea de către laborator a recoltării unui nou p.p. de calitate, care să permită stabilirea diagnosticului microbiologic, trebuie înţelese ca un gest normal atunci când anumite reguli de recoltare şi transport sunt neglijate.

În anumite situaţii, chiar dacă sunt sesizate diferite disfuncţionalităţi în ceea ce priveşte modul în care p.p. a fost recoltat şi transportat către laborator, problemele pot fi rezolvate prin telefon sau o discuţie directă, spre exemplu în vederea identificării unui p.p. care a fost recepţionat fără datele de identificare. Însă, în cazul în care această discuţie nu poate conduce la stabilirea identităţii p.p., respectiva probă nu trebuie prelucrată în laborator.

În cazul în care p.p. a fost identificat dar este necorespunzător din punct de vedere calitativ, prelucrarea acestuia ar trebui temporizată (p.p. menţinut la +4°C) până în momentul în care se ia legătura cu medicul care a solicitat analiza şi se analizează dacă recoltarea ar putea fi repetată şi urmată de trimiterea unui p.p. corespunzător. În cazul în care o nouă recoltare este posibilă primul p.p. se îndepărtează şi se va prelucra al doilea. În cazul în care nu este posibilă o nouă recoltare şi se estimează că prelucrarea p.p. chiar necorespunzător poate aduce vreun beneficiu pacientului examinat, se încearcă obţinerea datelor care pot fi obţinute (cu rezervele de rigoare care vor fi menţionate în buletinul de analiză).

Iată câteva motive de respingere a unui produs patologic:

- spută recoltată pe parcursul a 24 de ore;
- „spută" care de fapt conţine salivă şi secreţii din tractul respirator superior;
- urină recoltată cu mai mult de 60 de minute în urmă (care nu a fost menţinută la +4°C);
- exsudat faringian, exsudat nazal, spută, urină, materii fecale etc pentru care se solicită izolarea şi identificarea germenilor anaerobi;
- produse patologice pentru care este evidentă contaminarea (de ex. datorită unui recipient de colectare necorespuzător) etc.

Transportul produselor patologice

În ceea ce priveşte transportul produselor patologice este semnificativă propoziţia următoare: produsele patologice trebuie să ajungă în laborator în **cel mai scurt timp posibil.** Faţă de această recomandare cu caracter general, ar fi de discutat o serie de aspecte concrete.

Transportul cât mai rapid/sau prelucrarea imediată a unui p.p. recoltat chiar la nivelul laboratorului sunt recomandate ferm datorită următoarelor considerente:

- este necesară menţinerea condiţiei iniţiale a produsului patologic (conţinut microbian, citologie etc) pentru a putea înregistra o „imagine" cât mai apropiată de ceea existentă la nivelul procesului infecţios
  - diferitele microorganisme au diferite temperaturi optime pentru supravieţuire;
  - celelalte condiţii necesare supravieţuirii microorganismelor diferă în funcţie de fiecare grup de microorganisme în parte (pH, deshidratare, radiaţii UV sau radiaţii solare în general, prezenţa oxigenului, prezenţa substanţelor antimicrobiene, fenomene de autoliză etc);
  - microorganismele din flora asociată se pot multiplica în cursul transportului (de regulă mai lesne decât microorganismele patogene);
  - utilizarea mediilor de transport modifică aspectul citologic al p.p.;
- este necesară prevenirea contaminării p.p. precum şi prevenirea contaminării mediului extern sau a personalului care asigură recoltarea, transportul şi ulterior prelucrarea p.p.;
- în anumite situaţii (rezistenţa microorganismului în mediul exterior este deosebit de redusă) se va recomanda recoltarea şi prelucrarea p.p. „la patul bolnavului" sau, dacă este posibil, pacientul va fi invitat în laborator pentru recoltare;
- pentru foarte multe dintre p.p. se poate accepta un timp de transport de 1-2 ore (repetăm propoziţia de mai sus: p.p. trebuie să ajungă în laborator în cel mai scurt timp posibil);
- în cazul în care timpul de transport al p.p. nu poate respecta ceea ce este indicat se poate recurge la „conservarea" acestuia după cum urmează
  - menţinerea la temperatură scăzută (container izoterm cu gheaţă la 0°C sau frigider la +4°C); de menţionat că *Neisseria meningitidis, Neisseria gonorhoeae, Haemophilus influenzae* etc nu rezistă la aceste temperaturi;
  - utilizarea unui mediu de transport (Cary Blair, Stuart etc./vezi capitolul 9)
  - adăugarea de penicilină, streptomicină şi cloramfenicol atunci când se urmăreşte izolarea unui fung (agenţii etiologici ai micozelor cutanate superficiale pot rezista împachetate în hârtie sterilă şi introduse într-o cutie Petri până la 48 de ore fără să necesite adăugarea de antibiotice);
  - aspirarea p.p. lichid în seringă, cu eliminarea rapidă a bulelor de aer şi „închiderea" seringii cu ajutorul unui dop de cauciuc steril în care introducem imediat acul (atenţie la manevrarea acului de seringă în condiţiile recoltării unui produs patologic uman/risc de înţepare şi transmiterea altor infecţii ex. HIV) atunci când urmărim izolarea unei bacterii anaerobe care ar putea supravieţui în acest caz circa 30 de minute etc;
- transportul către laborator se va realiza
  - numai de către un curier instruit în acest scop;
  - în recipiente etanşe pe care se va lipi pictograma pentru „risc microbiologic";
  - iar în cazul în care p.p. trebuie expediat prin poştă se vor respecta normativele legale în vigoare precum şi recomandările speciale recunoscute la nivel internaţional dintre care cele mai utilizate sunt elaborate de World Health Organization

(WHO), Center for Diseases Control and Prevention (CDC) sau National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) cu menţiunea că primele 2 pot fi obţinute în mod gratuit.

Exemple de recoltare şi transport pentru câteva produse patologice

1. Exsudate otice sau nazale

- pacientul stă pe scaun, cu faţa spre sursa de lumină (preferabil lumina naturală);
- utilizăm tampoane cu vată obişnuite uşor umezite cu soluţie salină fiziologică sterilă, ceva mai mici decât în cazul recoltării exsudatului faringian
  - un tampon va fi utilizat pentru examen microscopic direct;
  - un tampon va fi utilizat pentru însămânţare pe medii de cultură;
  - în cazul suspicionării difteriei se vor utiliza 3 tampoane.
- tamponul trebuie încărcat cât mai bine cu p.p. (îl rotim relativ ferm pe suprafeţele unde este prezent p.p.);
- este de preferat utilizarea imediat a p.p. iar în cazul în care acest lucru nu este posibil, tamponul va fi trimis către laborator în mediu de transport.

2. Exsudatul faringian

- se recoltează preferabil dimineaţa înainte ca pacientul să mănânce şi fără să se fi spălat pe dinţi, fără să fi utilizat gargarisme cu diferite soluţii (iar dacă aceste condiţii nu au fost respectate, recoltarea se va face după minim 4 ore)
- pacientul stă pe scaun, cu faţa spre sursa de lumină şi gâtul în uşoară extensie
- ne aşezăm puţin lateral faţă de pacient pentru a evita contaminarea cu picături eliminate în cursul unui eventual acces de tuse (de preferinţă vom purta mască şi ochelari);
- deprimăm baza limbii cu ajutorul unui apăsător de limbă steril şi în condiţii de iluminare adecvată examinăm faringele posterior, pilierii, amigdalele pentru a sesiza care sunt zonele inflamate (roşii, cu depozite, ulceraţii etc) şi eventualele depozite purulente;
- utilizăm tampoane cu vată obişnuite
  - un tampon va fi utilizat pentru examen microscopic direct;
  - un tampon va fi utilizat pentru însămânţare pe medii de cultură;
  - în cazul suspicionării difteriei se vor utiliza 3 tampoane;
- solicităm pacientului să pronunţe „A" şi printr-o mişcare de ştergere, circulară, fermă, recoltăm secreţia de la nivel faringian, amigdalian insistând în zonele unde există ulceraţii, depozite (în cazul în care se remarcă prezenţa unei false membrane o detaşăm cu grijă înspre periferie şi recoltăm secreţia care există sub această structură);
- trebuie să evităm atingerea bazei limbii sau a palatului moale;
- este de preferat utilizarea imediat a p.p., sau în cel mult 1-3 ore; în cazul în care acest lucru nu este posibil, tamponul va fi trimis către laborator în mediu de transport.

3. Sputa

- în diagnosticul microbiologic al infecţiilor acute ale căilor respiratorii inferioare (IACRI) se pot examina
  - prelevate care se pot contamina în cursul recoltării cu flora bacteriană normală: spută, tampon nazal/faringian, aspirat nazal/faringian, aspirat hipofaringian, produs recoltat prin bronhoscopie simplă etc şi/sau
  - prelevate care permit evitarea contaminării orofaringiane: aspirat transtraheal, aspirat transtoracic, aspirat bronhoscopic prin cateter protejat cu canule telescopate/lavaj bronhoalveolar, biopsie transbronşică, biopsie pulmonară pe torace deschis, aspirat pleural, hemoculturi.
- cu toate că este contaminată cu flora normală orofaringiană, sputa reprezintă produsul patologic recoltat cel mai frecvent, în majoritatea IACRI. Se pot obţine probe calitativ corespunzătoare în momentul în care pacientul se prezintă în unitatea sanitară (este recomandabil să se recolteze prima spută eliminată matinal şi în nici un caz sputa din 24 de ore). Pacientul trebuie să înţeleagă diferenţa dintre „a expectora" şi „a tuşi şi scuipa".
- înaintea prelevării se recomandă periajul simplu al dinţilor, clătirea energică a gurii şi gargara cu apă (sau cu soluţie salină fiziologică);
- dacă proba apare constituită în principal din salivă, trebuie să solicităm imediat prelevarea unei noi probe care să permită ulterior definitivarea diagnosticului. În IACRI o probă mucopurulentă în volum de 2-3 ml ar putea fi suficientă;
- stimularea expectoraţiei prin inhalarea de aerosoli calzi cu soluţie salină (3%) oferă, de regulă, probe citologic nesatisfăcătoare (sputa indusă ar putea fi utilă în izolarea *Pneumocystis carinii).* În cazul în care se presupune o infecţie mycobacteriană sau fungică este recomandată recoltarea şi prelucrarea a 3 produse, în 3 zile consecutive;
- spălarea sputei intens mucopurulente (în 3 băi succesive de soluţie salină izotonă) reduce contaminarea orofaringiană fără a influenţa semnificativ concentraţia bacteriei infectante prinsă în trama fibrinoasă a probei. Fluidifierea (de ex. cu N-acetil-L-cisteină) permite omogenizarea produselor patologice; se realizează în câteva minute;
- în cazul suspicionării unei infecţii fungice, probele fluide se concentrează prin centrifugare 20 de minute la 3000 rot/min., apoi se examinează sedimentul. Din probele bioptice se disecă mici fragmente suspecte cu volume de circa 1 mm care sunt apoi examinate la stereomicroscop (mărire 30). Ţesutul cazeos, fibros şi grăsimea ascund în mod frecvent hifele iar tratarea cu KOH nu clarifică preparatul fiind necesară disocierea şi omogenizarea probei;
- produsele patologice recoltate pentru diagnosticul microbiologic trebuie transmise prompt către laborator (preferabil în maxim 1 oră, acceptabil în 1-2 ore);
- produsele recoltate într-un recoltor steril de 50-200 ml, cu capac care permite o închidere etanşă, sunt etichetate şi expediate imediat la laborator pentru a fi examinate. Nu există modalităţi optime de conservare a probelor. Menţinerea la o temperatură de 4°C previne multiplicarea contaminanţilor, conservă unii patogeni, dar scade până la anulare şansa de izolarea a altora (ex. *H. influenzae, N. meningitidis).*

- utilizarea unui mediu de transport perturbă raportul dintre bacterii şi reperele citologice ale probei, esenţiale pentru apreciere calităţii probei şi interpretarea rezultatelor sputoculturii, dar în cazul în care se apreciază că se va depăşi timpul de transport recomandat se poate utiliza mediul Stuart sau Amies. În cazul în care se urmăreşte, spre exemplu, izolarea *M. pneumoniae*, cultivarea trebuie făcută cât mai rapid; produsul patologic poate fi conservat maxim 4 ore în lipsa unui mediu special şi până la maxim 24 de ore dacă se utilizează mediul de transport pentru molicute. În cazul în care ar fi necesară o conservare prelungită, este necesară utilizarea unei temperaturi de –70°C (în nici un caz temperatura congelatorului obişnuit).

4. Puroiul

- există numeroase condiţii clinice în care apar supuraţii (superficiale sau profunde) iar tehnica de recoltare variază în funcţie de „originea" puroiului (arsuri şi plăgi suprainfectate, abcese, flegmoane etc);
- este recomandat ca pentru recoltare să folosim tampoane cu vată sterile numai în cazul în care nu avem o altă soluţie;
- puroiul poate fi recoltat cu ansa bacteriologică, pipeta Pasteur, prin biopsiere, chiuretare sau, atunci când este vorba de colecţii profunde, prin puncţie şi aspirare;
- în special pentru situaţiile în care vom recolta p.p. dintr-o colecţie profundă, colaborarea între clinică şi laborator trebuie să fie foarte bună;
- atunci când suspicionăm o infecţie cu microorganisme anaerobe sunt necesare pregătiri speciale şi cel puţin utilizarea seringii care se „închide" cu dop (vezi mai sus); există germeni anaeobi care pot fi distruşi în câteva secunde de contact cu oxigenul;
- transportul către laborator se va realiza utilizând medii de transport sau containere speciale (pentru asigurarea anaerobiozei); p.p. trebuie să fie prelucrat în 1-2 ore.

5. Materiile fecale (vezi capitolul 28)

6. Urina (vezi capitolul 29)

7. Sângele (vezi capitolul 31)

8. Lichidul cefalo-rahidian

- se recoltează în cazul suspicionării prezenţei unui sindrom meningeal, după examinarea fundului de ochi (verificăm presiunea în artera centrală a retinei, semne de stază papilară);
- suspiciunea este ridicată de medicul de specialitate (boli infecţioase, neurologie, medicină internă etc) iar recoltarea se va face la patul bolnavului de către medicul care are competenţa de a executa această manevră (ex. prin puncţie lombară);
- tehnicile de asepsie trebuie să fie riguroase în toate situaţiile, dar în cazul recoltării LCR atenţia trebuie să fie şi mai sporită;
- chiar dacă acest manual de lucrări practice se adresează numai infecţiilor bacteriene şi fungice, trebuie să privim lucrurile în ansamblul lor şi drept exemplu, să nu uităm că există meningite infecţioase şi meningite neinfecţioase iar meningitele infecţioase pot fi fungice, bacteriene, parazitare, virale, prionice; în plus, pentru elucidarea etiologiei

unei meningite este necesară efectuarea unor examinări biochimice adiacente celor citologice şi microbiologice astfel încât este de dorit recoltarea (la adult) a unei cantităţi de 5-10 ml LCR; recoltarea p.p. este invazivă şi va trebui să fim în stare să executăm toate testele necesare fără a solicita repetarea puncţiei lombare;

- recomandăm recoltarea LCR în 2-3 tuburi sterile (2 tuburi vor fi centrifugate iar din al treilea tub se vor realiza testele biochimice şi alte teste utile pentru a sugera etiologia); dacă LCR este franc purulent, examenul microscopic direct se face fără centrifugare;
- în mod ideal, LCR trebuie prelucrat imediat, cu alte cuvinte recoltarea şi procesarea p.p. trebuie să înceapă „la patul bolnavului"; recomandăm ca pe lângă trusa necesară manevrei de recoltare să avem la dispoziţie o spirtieră, stative pentru eprubete, medii de cultură diverse (agar-sânge, Lõwenstein, Sabouraud etc);
- dacă LCR urmează a fi transportat, transportul trebuie să se facă cât mai rapid şi la o temperatură apropiată de temperatura corpului uman (în nici un caz la +4°C; atât *Haemophilus influenzae* cât şi *Neisseria meningitidis*, agenţi etiologici recunoscuţi ai meningitelor bacteriene sunt distruşi prin refrigerare);
- un al motiv în favoarea unui transport şi o prelucrare foarte rapidă a LCR este reprezentat de studiul citologic al p.p. şi mai precis de numărarea leucocitelor polimorfonucleare care încep să fie distruse în număr semnificativ încă din primele 30-60 minute după recoltare.

9. Secreţii recoltate de la nivelul aparatului genital

- există mai multe tipuri de secreţii care ar putea fi recoltate în funcţie de manifestarea clinică; în materialul de faţă vom discuta doar o parte dintre acestea;
- în cazul secreţiei uretrale, la bărbat
  - recoltarea p.p. trebuie să se facă dimineaţa, înainte de micţiune, sau la cel puţin 2 ore după aceasta; în cazul în care pacientul nu se prezintă dimineaţa şi nu este respectată condiţia de mai sus iar după 2 ore de la micţionare secreţia este în cantitate prea mică, îi vom recomanda să consume cât mai puţine lichide în restul zilei şi să revină în dimineaţa următoare, înainte de micţiune;
  - sunt necesare tampoane de vată sterile (un tampon pentru examenul microscopic şi al doilea pentru cultivare) sau, alternativ o ansă bacteriologică sterilă; este recomandabil ca ansa să aibă firul şi bucla de platină (sau ar putea fi o ansă bacteriologică de unică întrebuinţare)
  - se observă penisul şi meatul urinar precum şi dacă există secreţie uretrală
  - dacă există secreţie uretrală, aceasta este recoltată cu tamponul (sau cu ansa);
  - în cazul în care nu se evidenţiază secreţie uretrală în mod spontan, cu mâna protejată de o mănuşă de latex, exprimăm uretra utilizând degetul mare şi indexul şi recoltăm secreţia care apare;
  - dacă nici prin această manevră nu putem obţine p.p. vom recurge la recoltarea intrauretrală cu tamponul (sau cu ansa);
  - în acest scop sunt necesare tampoane de dimensiuni mai mici, preferabil din alginat de calciu (sau dacron în suspiciunea unei infecţii cu *Chlamydia spp.* sau

Mycoplasma spp.); după introducerea blândă, pe circa 2 centimetri lungime şi rotirea intrauretral a primului tampon, al doilea tampon va fi inserat cu aproximativ 1 centimetru mai profund;

- în suspiciunea de gonoree se recomandă cultivarea imediat după recoltare pe mediul de cultură încălzit la 37°C; în cazul în care acest lucru nu se poate realiza, tamponul cu p.p. va fi transmis laboratorului în mediu de transport (ex. mediul Amies cu cărbune activat pentru *Neisseria gonorhoeae* sau alte variante pentru *Chlamydia spp.* sau *Mycoplasma spp.).*

- în cazul secreţiilor cervicale, la femei
  - recoltarea se va face preferabil în primele 10 zile după ciclul menstrual, pe masa ginecologică, după introducerea valvelor ginecologice şi examinarea vizuală a vaginului şi colului uterin;
  - dacă se remarcă o secreţie purulentă, cu ajutorul unor comprese sterile se îndepărtează secreţia de la nivelul colului extern;
  - folosim 3 tampoane sterile introduse şi rotite uşor 1-2 centimetri în colul uterin (2 dintre tampoane le vom utiliza pentru frotiuri Gram şi Giemsa, iar al treilea pentru cultivare procedând aşa cum am menţionat mai sus).

10. Diferite p.p. recoltate în suspiciunea unor infecţii fungice

- în infecţiile fungice, în funcţie de localizare se pot recolta p.p. foarte variate;
- spre exemplu, în micozele cutanate superficiale
  - după antiseptizarea leziunii cu alcool medicinal (70°) raclăm tegumentul şi utilizăm pentru examinare scuamele produse;
  - atât scuamele cât şi alte structuri (fire de păr, fragmente de unghie etc) se împachetează în hârtie sterilă care se introduce într-o cutie Petri şi se trimite pentru prelucrare şi examinare în laborator (în maxim 48 de ore).
- în micozele profunde, în funcţie de localizare
  - recoltăm p.p. şi îl transmitem către laborator având grijă să prevenim deshidratarea produsului;
  - se recomandă prelucrarea şi examinarea imediată (unii fungi sunt fragili; este de dorit să putem evalua situaţia fungilor foarte aproape de momentul recoltării pentru a putea înţelege care a fost situaţia in vivo);
  - iar în caz contrar adăugăm penicilină, streptomicină şi cloramfenicol pentru inhibarea multiplicării bacteriene şi menţinem p.p. la +4°C (supravieţuirea la această temperatură depinde de fungul implicat şi poate varia de la ore la 2 săptămâni, aşa cum se întâmplă în cazul unor fungi dimorfi).

Aşa cum am menţionat, datele prezentate nu cuprind toate posibilităţile şi variantele. Am încercat să dăm doar câteva exemple care sunt orientative. Pentru cei interesaţi există manuale dedicate exclusiv recoltării şi transportului produselor patologice, în microbiologie.

Pentru trei dintre p.p. am ales o altă modalitate de prezentare. Recoltarea urinii, materiilor fecale şi sângelui va fi discutată în partea specială.

7. PREPARATE MICROSCOPICE, FROTIURI ȘI PRINCIPALELE COLORAȚII UTILIZATE ÎN MICROBIOLOGIE

Microorganismele studiate au dimensiuni foarte mici, de ordinul micronilor, astfel încât pentru examinarea lor este necesară o mărire de circa 1.000, așa cum vom discuta și în capitolul următor. Există diferite tehnici prin care se poate pune în evidență prezența unor microorganisme însă, de mare utilitate este examenul microscopic care se poate adresa unor preparate microscopice proaspete (umede, între lamă și lamelă) sau unor frotiuri fixate și colorate în funcție de suspiciunea diagnostică, p.p. examinat etc.

În schema generală de diagnostic microbiologic (direct) vom examina microscopic produsul patologic (etapa a 2-a) sau colonia apărută pe mediul de cultură (etapa a 4-a, punctul b, identificarea pe baza caracterelor morfotinctoriale).

Uneori examenul microscopic este decisiv pentru diagnostic, alteori are un rol orientativ, însă, chiar din al doilea an de studiu ar fi bine ca viitorii medici să înțeleagă, rețină și ulterior să aplice cele învățate, indiferent de specialitatea pe care o vor urma.

Preparate microscopice proaspete (umede, native, între lamă și lamelă)

- este de preferat să folosim lame și lamele noi supuse următoarelor proceduri succesive (imersare în amestec sulfo-cromic câteva zile, spălare, clătire, păstrare în alcool 50%);
- lamele se usucă (folosim o cârpă curată) apoi se degresează suplimentar prin flambare (trecere de câteva ori prin flacăra becului Bunsen);
- depunem pe lamă o picătură din produsul care urmează a fi studiat;
  - dacă produsul patologic are consistență lichidiană (ex. urină, sediment urinar, materii fecale, LCR, serozitate din șancru presupus sifilitic etc) va fi utilizat ca atare; pentru o mai bună vizualizare putem adăuga albastru de metilen, lugol, tuș de India, nigrozină etc;
  - dacă cultura este realizată în mediu lichid (ex. pentru *Leptospira spp.)* se va utiliza ca atare;
  - dacă vrem să studiem spre exemplu mobilitatea microorganismelor care au format colonii pe un mediu solid vom descărca o ansă din colonie într-o picătură de soluție salină fiziologică, apă distilată sau bulion;
  - dacă p.p. este recoltat într-o suspiciune de micoză superficială, pe lama de microscop se va depune o picătură dintr-o soluție 10-20% KOH-glicerol în care se va descărca și dispersa p.p;
  - dacă vrem să studiem aspectul fungilor filamentoși (mucegaiuri) dintr-o colonie, pe lamă se va depune o picătură de soluție lactofenol-albastru coton în care vom descărca un fragment din periferia coloniei respective;
- acoperim picătura cu o lamelă;
  - cel mai frecvent presăm ușor lamela pentru a elimina eventualele bule de aer;

BCU "CAROL DAVILA" BUCUREȘTI LIBRARY

- în cazul p.p. recoltat într-o suspiciune de micoză superficială, încălzim uşor preparatul prin trecere cu grijă, de 2-3 ori, pe deasupra flăcării becului Bunsen;
- dacă vrem să studiem aspectul fungilor filamentoşi (mucegaiuri) dintr-o colonie, nu trebuie să mişcăm sau să presăm lamela;
- în microscopia optică pe câmp luminos aşezăm preparatul pe platina microscopului şi examinăm iniţial cu obiectivul 10, apoi cu obiectivul 20 sau 40 (de regulă nu folosim obiectivul de imersie); se pot folosi şi alte tehnici microscopice.

Frotiuri (preparate microscopice fixate şi colorate)

Structura peretelui microbian determină o anumită afinitate faţă de coloranţi, ceea ce permite examinarea şi diferenţierea bacteriilor sau fungilor în frotiuri.

- frotiurile se pot realiza pornind de la produse patologice (recoltate de la om sau de la animale de experienţă) sau din cultura microbiană (în mediu lichid sau solid);
- frotiul trebuie întins în strat cât mai subţire (preferabil în unistrat)
- este de preferat să folosim lame şi lamele noi supuse următoarelor proceduri succesive (imersare în amestec sulfo-cromic câteva zile, spălare, clătire, păstrare în alcool 50%)
- lamele se usucă (folosim o cârpă curată) apoi se degresează suplimentar prin flambare (trecere de câteva ori prin flacăra becului Bunsen)
- **Executarea frotiurilor din p.p. cu consistenţă fluidă sau din culturi microbiene realizate în mediu de cultură lichid**
  - după ce am flambat lama, o aşezăm cu partea flambată în sus
  - sterilizăm ansa bacteriologică şi aşteptăm să se răcească
  - prelevăm aseptic p.p./cultură şi depunem produsul în centrul lamei
  - întindem prin mişcări de „dute-vino" (de „haşurare") pe axul lung al lamei produsul prelevat, în strat cât mai subţire, având grijă să nu ne apropiem de marginile lamei/întinderea se poate face şi prin mişcări circulare, excentrice;
  - lăsăm lama să se usuce lângă becul de gaz (nu grăbim uscarea prin eventuale treceri ale frotiului prin flacără) – în cazul în care avem în dotare un dispozitiv în care lama se poate aşeza şi usca la +70°C, vom utiliza această metodă;
  - fixăm frotiul; există metode chimice de fixare, însă cel mai frecvent folosim fixarea prin căldură, distrugând în acelaşi timp şi microorganismele (care prezintă o afinitate tinctorială mai mare decât celulele vii);
  - în acest scop, trecem frotiul prin flacără (aşa cum am procedat şi pentru flambarea lamei, înainte de executarea frotiului) însă de această dată partea pe care am întins p.p. sau cultura este orientată în sus; ca o modalitate de control, atingem dosul mâinii cu lama flambată, iar temperatura atinsă prin flambare nu trebuie să fie mai mare decât pe care o putem suporta;
  - frotiul fixat este gata pentru colorare;
- **Executarea frotiurilor din p.p. cu consistenţă solidă sau din culturi microbiene realizate în mediu de cultură solid**

- după ce am flambat lama, o aşezăm cu partea flambată în sus;
- cu ajutorul flaconului cu picurător sau cu ansa bacteriologică sterilizată şi răcită depunem în centrul lamei o picătură de soluţie salină fiziologică sau apă distilată;
- sterilizăm ansa bacteriologică şi aşteptăm să se răcească;
- prelevăm aseptic p.p./un fragment din colonie şi depunem produsul în picătura de fluid de pe lamă;
- omogenizăm foarte bine p.p./fragmentul de colonie în picătura de fluid;
- procedăm ca mai sus pentru întinderea, uscarea şi fixarea frotiului;

- **Executarea amprentelor de organ/alte p.p.**
  - flambăm lama;
  - cu partea flambată atingem suprafaţa de secţiune a organului respectiv;
  - lama se poate aplica şi pe suprafaţa de secţiune a unor prelevate bioptice sau obţinute prin necropsie;
  - procedăm ca mai sus pentru uscarea şi fixarea frotiului.

Colorarea frotiurilor

Există foarte numeroase metode de colorare a frotiurilor. Dintre acestea vom prezenta doar câteva dintre coloraţiile folosite mai frecvent.

În vederea colorării avem nevoie de o trusă pentru colorare (stativ de colorare, coloranţi conform „reţetei" de colorare, apă distilată sau apă curentă pentru spălare, stativ de uscare).

Pentru colorarea **frotiurilor din produs patologic** folosim cel mai frecvent coloraţiile cu albastru de metilen (A.M.), Giemsa, Gram şi după caz, Ziehl-Neelsen. În funcţie de suspiciunea diagnostică şi p.p. examinat se pot folosi şi alte coloraţii (de ex. coloraţia Gimenez pentru depistarea rickettsiilor pe amprente de organ de la animale infectate experimental sau coloraţia cu albastru de toluidină pentru evidenţierea *Pneumocystis carinii).*

În cazul multora dintre coloraţiile uzuale au fost realizate diferite modificări în funcţie de experienţa autorilor şi scopul urmărit. De ex. coloraţia cu A.M poate avea următoarele variante:

- albastru de metilen Löffler pentru cele mai multe coloraţii simple sau ca un al doilea colorant în coloraţia Ziehl-Neelsen;
- albastru de metilen policrom pentru evidenţierea *Bacillus anthracis* în p.p., pentru corynebacterii sau înlocuind coloraţia de mai sus;
- albastru de metilen (varianta Wayson) pentru p.p., cu o sensibilitate mai bună decât utilizarea A.M. Löffler etc.

În cursul lucrărilor practice precum şi în manualul de faţă se va discuta numai câte o variantă cu referire la principalele coloraţii folosite în microbiologie. Cei interesaţi au la dispoziţie pentru studiu un bogat material teoretic iar după încheierea antrenamentului personal în ceea ce priveşte realizarea de frotiuri şi coloraţii, fiecare va putea alege o variantă, aplicabilă în funcţie de situaţie.

Pentru colorarea frotiurilor obţinute din cultură vom folosi în special coloraţiile Gram, Ziehl-Neelsen şi alte coloraţii specifice, după caz (coloraţii pentru cili, capsulă, spori etc).

Coloraţia cu albastru de metilen

- acoperim frotiul cu soluţie de albastru de metilen, pentru 3-4 minute (nu are rost să acoperim cu colorant lama în întregime);
- spălăm cu apă distilată sau apă de la robinet;
- aşezăm frotiul în stativ pentru uscare (de preferat) sau grăbim uscarea prin tamponare cu sugativă sau hârtie de filtru;
- examinăm la microscop, notăm observaţiile, interpretăm.

Coloraţia Giemsa

- fixarea frotiului nu se face „la cald" ci chimic, cu alcool metilic (de ex. timp de 1 minut);
- scurgem lama şi aşteptăm evaporarea alcoolului metilic;
- acoperim frotiul cu soluţie May-Grünwald (diluată în părţi egale cu tampon fosfat), pentru 3 minute;
- înclinăm lama şi scurgem soluţia colorantă (care are şi rol fixator);
- acoperim frotiul cu soluţie Giemsa, pentru 10 minute;
- spălăm cu tampon fosfat;
- aşteptăm ca frotiul să se usuce şi examinăm cu un obiectiv intermediar; dacă colorarea celulelor este mai slabă decât cea aşteptată acoperim din nou frotiul cu soluţie Giemsa, încă 10 minute;
- spălăm cu tampon fosfat
- aşezăm frotiul în stativ pentru uscare (de preferat) sau grăbim uscarea prin tamponare cu sugativă sau hârtie de filtru;
- examinăm la microscop, notăm observaţiile, interpretăm.

Coloraţia Gram

- diluăm într-un recipient fucsina (9 părţi apă distilată/1 parte fucsină);
- acoperim frotiul cu violet de metil sau cristal violet (violet de genţiană din punct de vedere istoric), pentru 1-3 minute (nu are rost să acoperim cu colorant lama în întregime);
- îndepărtăm colorantul;
- acoperim frotiul cu lugol (mordant, fixator) pentru 1-3 minute;
- îndepărtăm lugolul;
- acoperim frotiul cu un amestec de alcool-acetonă (1 parte acetonă/3 părţi alcool de 96°) pentru un timp foarte scurt, 7-8 secunde;
- spălăm insistent cu apă distilată sau apă de la robinet;
- acoperim frotiul cu fucsina diluată 1/10 pentru 1 minut;
- spălăm cu apă distilată sau apă de la robinet;
- aşezăm frotiul în stativ pentru uscare (de preferat) sau grăbim uscarea prin tamponare cu sugativă sau hârtie de filtru;

- examinăm la microscop, notăm observaţiile, interpretăm.

Coloraţia Ziehl-Neelsen

Este o coloraţie utilă în identificarea prezenţei de bacili acid-alcool rezistenţi (BAAR), solubilizând peretele bacterian prin creşterea temperaturii, facilitând penetrarea colorantului.

- punem frotiul uscat şi fixat pe un suport situat deasupra tăviţei de colorare;
- acoperim complet lama cu fucsină bazică nediluată (fin[illegible] extemporaneu);
- trecem becul de gaz aprins pe sub lama acoperită de fucsină, până începe emiterea de vapori (nu atingem temperatura de fierbere). În cazul în care lama nu mai este acoperită complet cu fucsină, adăugăm colorant. Timpul de lucru este de 10 minute, perioadă în care repetăm de 3 ori operaţia de încălzire a lamei până la emiterea de vapori;
- spălăm insistent cu apă distilată sau apă de la robinet;
- adaugăm amestecul decolorant acid-alcool (3 ml acid clorhidric concentrat/97 ml alcool etilic 90-95°), pentru 2-3 minute;
- spălăm cu apă distilată sau apă de la robinet;
- recolorăm cu albastru de metilen, 1 minut;
- spălăm cu apă distilată sau apă de la robinet;
- aşezăm frotiul în stativ pentru uscare (de preferat) sau grăbim uscarea prin tamponare cu sugativă sau hârtie de filtru;
- examinăm la microscop, notăm observaţiile, interpretăm.

Coloraţia Kinyoun

Este o coloraţie utilă în identificarea prezenţei de BAAR, fără a utiliza încălzirea în cursul etapelor de colorare (coloraţie „la rece").

- acoperim lama complet cu o hârtie de filtru decupată în acest scop;
- picurăm soluţie de fucsină fenicată Kinyoun până când hârtia de filtru se îmbibă complet şi aşteptăm 5 minute;
- îndepărtăm hârtia de filtru;
- spălăm insistent cu apă distilată sau apă de la robinet;
- acoperim lama cu amestecul decolorant acid-alcool pentru circa 30 secunde; vărsăm amestecul decolorant şi repetăm operaţia pentru încă 30 secunde
- spălăm insistent cu apă distilată sau apă de la robinet;
- acoperim frotiul cu albastru de metilen, pentru 1 minut (nu are rost să acoperim cu colorant lama în întregime);
- spălăm cu apă distilată sau apă de la robinet;
- aşezăm frotiul în stativ pentru uscare (de preferat) sau grăbim uscarea prin tamponare cu sugativă sau hârtie de filtru;
- examinăm la microscop, notăm observaţiile, interpretăm.

BCU "Ovidius" Constanța LIBRARY

Coloraţii fluorescente

Există mai multe variante, inclusiv coloraţii în care se utilizează anticorpi marcaţi fluorescent. Vom prezenta în continuare coloraţia fluorescentă cu auramină O. Este o coloraţie utilă în identificarea prezenţei de BAAR (sensibilitate crescută).

- colorăm cu soluţie de auramină O (amestec de auramină O, alcool etilic, fenol, apă distilată), pentru 15 minute;
- spălăm cu apă distilată;
- decolorăm cu amestec de acid-alcool, pentru 5 minute;
- spălăm cu apă distilată;
- „contracolorăm" cu soluţie de permanganat de potasiu, pentru 2 minute;
- spălăm cu apă distilată sau apă de la robinet;
- aşezăm frotiul în stativ pentru uscare (de preferat) sau grăbim uscarea prin tamponare cu sugativă sau hârtie de filtru;
- examinăm la microscop, notăm observaţiile, interpretăm.

Coloraţia Gimenez

Este o coloraţie utilă în identificarea rickettsiilor pe amprente de organ de la animale infectate experimental sau în culturi precum şi pentru identificarea incluziilor de *Chlamydia trachomatis* sau *Chlamydia spp.*

- acoperim lama cu xilol, pentru 5 minute;
- îndepărtăm xilolul;
- acoperim lama cu alcool etilic (96°), pentru 2-3 minute;
- îndepărtăm alcoolul;
- acoperim frotiul cu soluţia de fucsină fenicată preparată după reţeta Gimenez, pentru 1-2 minute, fucsina se picură pe frotiu printr-o pâlnie prevăzută cu o hârtie de filtru;
- spălăm insistent cu apă distilată sau apă de la robinet;
- acoperim frotiul cu soluţie de verde malachit, pentru 6-9 secunde;
- spălăm insistent cu apă distilată sau apă de la robinet;
- aşezăm frotiul în stativ pentru uscare;
- examinăm la microscop, notăm observaţiile, interpretăm.

În capitolul următor, după prezentarea microscopului optic (în câmp luminos), vom enumera o serie de date privind structurile care pot fi observate.

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

8. TEHNICA EXAMENULUI MICROSCOPIC ÎN DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC

Microscopul este un instrument absolut necesar în vederea stabilirii unui diagnostic bacteriologic direct (există tehnici de microscopie care pot fi utile şi în diagnosticul microbiologic indirect). Există mai multe categorii de microscoape. În mod uzual examenul microscopic utilizează microscopul optic (microscopia optică pe câmp luminos). În anumite situaţii se poate recurge la microscopia cu fond negru, microscopia cu contrast de fază sau la microscopia cu fluorescenţă. În cazul utilizării ultimelor trei tipuri de microscop este necesară o cameră obscură. Microscopia electronică, microscopia protonică sau alte tehnici sofisticate de microscopie nu fac obiectul materialului de faţă (aceste tehnici ar putea fi utilizate în cercetare, de ex. pentru a evidenţia inter-relaţia dintre bacterie şi bacteriofag).

Microscopul optic şi microscopia optică pe câmp luminos

Microscopul optic este un instrument care permite observarea obiectelor mai mici decât cele care pot fi văzute cu ochiul liber (sau cu lupa). Microscopul formează imagini virtuale, mărite şi răsturnate ale obiectului cu ajutorul unui sistem de lentile obiectiv şi de lentile ocular.

Distanţa minimă dintre două puncte ale unui obiect care mai pot fi văzute separat unul de celalalt prin microscop este:

$$d = \frac{1.22\lambda}{2n\sin u}$$

unde λ reprezintă lungimea de undă a radiaţiei folosite, **n** este indicele de refracţie al mediului străbătut de radiaţie între obiect şi ocular, iar **u** este unghiul dintre axa optică şi razele cele mai îndepărtate de axă care mai pătrund încă în obiectiv. Pentru a micşora această distanţă şi respectiv pentru a îmbunătăţi performanţele microsopului există mai multe metode dintre care vom menţiona două, utilizate şi în studiul microbiologic:

- utilizarea unor radiaţii cu lungime de undă λ cât mai mică (de ex. pentru radiaţia ultravioletă se pot distinge obiecte cu dimensiuni de 0,15 μm);
- mediul transparent dintre obiect şi obiectiv să aibă un indice de refracţie n cât mai mare (aşa cum se procedează în cazul microscopului cu imersie).

În microscopia optică pe câmp luminos lumina este transmisă de-a lungul axului optic al instrumentului, prin preparat, în aceste condiţii obţinându-se un câmp vizual puternic luminat, în care obiectele, pentru a putea fi văzute, se disting pe fondul luminos fie prin opacitate, fie prin culoarea lor (în special după utilizarea unor tehnici de colorare - a se revedea capitolul 7).

Pot fi realizate şi măsurători cu ajutorul micrometrelor (utile mai mult în diagnosticul parazitologic); micrometrele sunt plăcuţe de sticlă pe care sunt marcate scale fin divizate, de dimensiuni cunoscute, a căror imagine se poate suprapune peste imaginea obiectului de cercetat.

Părţile componente ale microscopului optic

Microscopul optic are următoarele părţile componente:

1. **Piciorul** microscopului, alcătuit dintr-o masă metalică cu rol de susţinere, pe care se sprijină platina microscopului. Pe **platina** microscopului se aşeaza preparatul. Platina prezintă un orificiu central care permite trecerea razelor luminoase şi orificii laterale în care sunt prinşi „cavalerii" cu ajutorul cărora preparatul este fixat pe platină. Cu ajutorul a 2 şuruburi ce se găsesc sub platformă, aceasta se poate deplasa pe 2 direcţii perpendiculare.

2. **Tubul** microscopului susţine **ocularul** şi **obiectivul**. Tubul poate fi deplasat mai rapid şi grosier cu ajutorul macrovizei şi mai lent şi fin cu ajutorul microvizei. La capătul superior al tubului se pot pune oculare cu diverse puteri de mărire, care se pot schimba uşor. Frecvent utilizăm în microbiologie oculare cu puterea de mărire 10.

Obiectivul se montează în **revolver**, situat la capătul inferior al tubului. Revolverul este un suport special care permite montarea mai multor obiective şi inter-schimbarea lor prin rotire. Obiectivul este compus dintr-un sistem centrat de lentile aşezate într-un tub metalic care se înşurubează la revolver. Puterea separatoare a microscopului este determinată de puterea separatoare a obiectivului a cărui putere de mărire este cu atât mai mare cu cât distanţa focală a acestuia este mai mică.

Există obiective uscate (ex. 10×, 20× sau 40×) şi cu imersie (ex. 90× sau 100×). Obiectivele uscate primesc fasciculul de lumină ce trece prin preparat direct prin aer, astfel că o parte din razele trimise de obiect către lentila concavă se pierd prin fenomenul de reflexie totală. Pierderea razelor de lumină datorită acestui fenomen se poate înlătura prin interpunerea între lamelă şi obiectiv a unei picături de ulei de cedru sau de alt lichid cu indice de refracţie apropiat de cel al sticlei din care este făcută lentila frontală a obiectivului, aşa cum se petrece în cazul obiectivelor cu imersie, foarte frecvent utilizate în microbiologie.

3. Dispozitivul de iluminare este format din **oglindă** şi **condensator**.

Oglinda are rolul de a dirija razele de la sursa de lumină spre axul optic al microscopului; prezintă o suprafaţă plană şi una concavă şi este fixată pe un suport, în aşa fel încât se poate roti în jurul a două axe perpendiculare.

4. **Condensatorul** este format din 2-3 lentile cu ajutorul cărora lumina reflectată de oglindă este concentrată asupra obiectului; fasciculului paralel de raze de lumină care cade pe condensator devine convergent. Pentru a obţine o imagine clară, condesatorul se poate deplasa pe verticală până când obiectul se găseşte în focarul fasciculului convergent care iese din condensator. Razele de lumină, înainte de intrarea în condensator, trec printr-un suport de filtre şi o diafragmă iris (diafragmă de apertură). Condensatorul contribuie în mod esenţial la luminozitatea imaginii.

Examinarea folosind microscopul optic în câmp luminos

1. Examinarea unui preparat proaspăt (între lamă şi lamelă)

Pe lamă se depune o picătură din suspensia care urmează a fi examinată, se acoperă cu o lamelă, se aşează pe platina microscopului şi se fixează cu ajutorul „cavalerilor".

Condensatorul este coborât circa 1,5 cm sub platină, diafragmul este semi deschis, iar obiectivul 40× este coborât până deasupra lamelei (privind prin lateral).

Privind prin oculare, rotim foarte încet macroviza ridicând uşor tubul microscopului până apare câmpul microscopic. Punem la punct imaginea cu ajutorul microvizei şi reglând lumina prin modificarea fantei condensatorului.

Se pot examina astfel: sedimentul urinar, materii fecale provenind de la un pacient cu diaree, suspensii de bacterii care se presupune că sunt mobile, preparate umede realizate în cazul suspicionării unei micoze cutanate superficiale etc

- sediment urinar/putem vizualiza: celule epiteliale (malpighiene, vezicale, uretrale etc), celule sanguine (leucocite, hematii), cilindrii urinari (hialini, leucocitari, eritrocitari, epiteliali, granulari etc), cristale urinare, levuri (eventual înmugurite, cu blastoconidii), *Trichomonas vaginalis* etc; examenul sedimentului urinar este **foarte util;**
- preparat montat în soluţie KOH/putem vizualiza: levuri (număr, formă, dimensiuni), blastoconidii, artroconidii, pseudohife, microorganisme asociate;
- preparat colorat cu tuş de India (coloraţie „negativă")/putem vizualiza: levuri capsulate, înconjurate de un halou clar pe fondul întunecat al preparatului, ex. *Cryptococcus neoformans;*
- în cazul în care se urmăreşte mobilitatea microorganismelor, trebuie să putem deosebi mişcarea reală de mişcarea browniană (oscilaţie pe loc a particulelor); urmărim reperele aflate în vecinătatea microorganismelor etc.

2. Examinarea unui preparat fixat şi colorat

Frotiul se aşează pe platina microscopului şi se fixează cu ajutorul „cavalerilor".

Centrăm zona pe care dorim să o examinăm. Procedăm ca mai sus utilizând obiectivul 40×; alegem câmpul pe care îl vom examina ulterior cu obiectivul cu imersie (de ex. un câmp în care sesizăm prezenţa leucocitelor).

Ridicăm tubul microscopului, punem o picătură de ulei de cedru pe lamă, în zona pe care urmează să o examinăm. Condensatorul este ridicat până sub platina microscopului şi are diafragmul deschis.

Privind din lateral, folosim macroviza şi coborâm obiectivul cu imersie (90× sau 100×) până atingem suprafaţa lamei realizând contactul şi cu uleiul de cedru. Manevra trebuie realizată cu grijă pentru a nu sparge frotiul.

Privim prin oculare şi rotim foarte încet macroviza ridicând foarte încet tubul microscopic, până prindem imaginea câmpului. Cu ajutorul microvizei punem la punct imaginea.

Se pot examina: morfologia celulelor din produsul patologic, prezenţa leucocitelor şi dacă acestea sunt modificate, prezenţa bacteriilor şi dispunerea acestora (ex. intra sau extraleucocitar), morfologia bacteriilor, morfologia unor paraziţi, morfologia levurilor, aspectul frotiurilor de sânge etc

- frotiu colorat cu albastru de metilen (A.M.)/putem vizualiza: bacterii colorate în albastru închis, în cazul bacteriilor capsulate, capsula va apărea ca un halou necolorat, celule diferite (în funcţie de sediul recoltării) şi celule inflamatorii pentru care nucleul apare într-o culoare albastru mai închis în timp ce citoplasma apare cu nuanţe de albastru; coloraţia cu A.M. permite o mai bună diferenţiere a detaliilor structurale;
- frotiu colorat Giemsa/putem vizualiza: hematii (roz-roşii), polimorfonucleare neutrofile (citoplasmă roz, granulaţii brune, nucleu violaceu), polimorfonucleare eozinofile (citoplasmă roz, granulaţii brune, nucleu violaceu), limfocite şi macrofage (citoplasmă albastră, nucleu violaceu), bacterii colorate în violet, forme trofice de *Pneumocystis carinii* (nucleu roşu, citoplasmă albastră), *Histoplasma capsulatum* în citoplasma

celulelor fagocitare (levuri colorate în roşu), incluziuni de *Chlamydia trachomatis* (corpusculii reticulaţi apar albaştri, corpusculii elementari apar roşii) etc;

- frotiu colorat Gram;
  - în cazul în care frotiul a fost realizat din cultură pură putem vizualiza microorganisme cu aceeaşi formă, aceleaşi dimensiuni (excepţie *Proteus spp.),* o anumită dispoziţie, cu sau fără capsulă (halou necolorat), gram pozitive (colorate în violet) sau gram negative (colorate în roşu), levurile se colorează în violet;
  - în cazul în care frotiul a fost realizat din produs patologic putem vizualiza celule diferite (în funcţie de sediul recoltării) şi celule inflamatorii pentru care nucleul şi citoplasma apar în diverse nuanţe de roşu, bacterii gram pozitive şi/sau gram negative, fibrină şi levuri care se colorează în violet etc;
- frotiu colorat Ziehl-Neelsen sau Kinyoun/putem vizualiza: bacili de culoare roşie, relativ fini (în cazul prezenţei BAAR), alte bacterii (ne-AAR), celule diferite (în funcţie de sediul recoltării) şi celule inflamatorii de culoare albastră (toate structurile ne-AAR apăr colorate albastru) etc; în cazul colorării unui frotiu din cultură pură vom evidenţia numai bacili de culoare roşie.

Întreţinerea microscopului

După terminarea examenului microscopic trebuie efectuate următoarele proceduri:

- închidem sursa de lumină;
- ridicăm cu ajutorul macrovizei tubul microscopului;
- coborâm condensatorul;
- scoatem lama (sau lama şi lamela) de pe platina microscopului;
  - preparatele proaspete le punem în borcanul cu amestec dezinfectant;
  - preparatele fixate (pe care urmează să le păstrăm) se introduc într-un container cu xilol (1-2 minute) apoi, după evaporarea xilolului se pun într-o cutie;
- ştergem lentila obiectivului cu imersie cu pulpa degetului sau cu o hârtie moale, specială, pentru a o curăţa de uleiul de cedru (periodic, vom şterge lentila acestui obiectiv cu un tifon foarte curat îmbibat în xilol);
- curăţăm platina microscopului şi lentila condensatorului cu tifon curat îmbibat în xilol;
- acoperim microscopul cu o husă de plastic sau pânză, pentru a-l feri de praf;
- pentru a preveni efectul nedorit al multiplicării unor fungi asupra sistemului optic, o recomandare ar fi menţinerea microscopului într-un ambalaj de polietilenă împreună cu o substanţă desicantă, spre exemplu silicagel.

Microscopul cu fond întunecat (negru)

Pentru acest tip de examinare este utilizat un microscop optic obişnuit la care se adaptează o sursă de lumină cu intensitate mare şi un condensator cardioid (cu oglinzi sferice concentrice), cu posibilităţi de diafragmare a luminii. Condensatorul pentru câmp întunecat (fond negru) opreşte accesul spre obiectiv al razelor de lumină directe, iar obiectul este iluminat oblic. Astfel o parte dintre razele difractate şi reflectate de obiectul iluminat oblic pătrund în obiectiv care apare luminos pe fondul întunecat al câmpului.

Pentru a evita reflexia totală a razelor, înainte ca obiectul să fie luminat, acesta este imersat într-o peliculă de lichid (lichid de imersie cu indice de refracţie mai ridicat, ex. glicerina). Lamele trebuie să aibă grosimea de 1 milimetru (distanţa focală a condensatorului fiind 1,2 milimetri).

Tehnica de examinare

După centrarea diafragmei de câmp folosind obiectivul cu mărire 10× şi condensatorul pentru câmp luminos, trebuie să înlocuim acest condensator cu condensatorul cardioid. Condensatorul cardioid este cu diafragma închisă. Ridicăm condensatorul până la nivelul platinei microscopului şi punem pe lentila condensatorului o picătură de glicerină.

Pregătim preparatul proaspăt (între lamă şi lamelă) şi îl plasăm pe platina microscopului astfel încât să vină în contact cu glicerina de pe lentila condensatorului. Fixăm preparatul cu ajutorul „cavalerilor".

Examinăm iniţial cu obiectivul 10×, apoi cu obiectivul 40× coborât până aproape de suprafaţa lamelei; punem la punct imaginea cu ajutorul microvizei. Când obţinem imaginea curgerii curentului de lichid ştim că am „prins" câmpul microscopic. Utilizând mai departe microviza punem la punct detaliile şi apoi înregistrăm ceea ce am examinat.

Examinarea la microscopul cu fond negru este indicată în mod special pentru examinarea morfologiei şi mobilităţii pentru *Treponema pallidum* în serozitatea din şancrul sifilitic sau pentru *Leptospira spp.* în produs patologic (ex. urină) sau din medii de cultură.

- lichidul clar recoltat şi şancrul sifilitic trebuie examinat în maxim 20 minute după recoltare; putem vizualiza spirochete luminoase, fine, lungi, cu spire regulate, capete efilate, cu mişcări de înşurubare, flexie, translaţie, pe fond negru;
- în preparatul proaspăt care conţine leptospire putem vizualiza filamente luminoase, spiralate, foarte mobile, cu mişcări de înşurubare şi flexie, pe fond negru.

Microscopul cu contrast de fază

Pentru acest tip de examinare este necesar să avem în dotarea microscopului o serie de piese strict necesare, respectiv: un condensator special care include o serie de diafragme inelare, obiective de fază (de fapt obiective obişnuite la care în planul focal superior a fost montată o placă de fază; obiectivele de fază sunt gravate cu „Ph"), oculare de centrare, lampă cu intensitate luminoasă mare, filtru verde.

Folosind microscopia cu contrast de fază este posibilă observarea obiectelor transparente care prezintă variaţii de grosime sau variaţii ale indicelui de refracţie în structura lor. Sunt utilizate preparate microscopice proaspete. Faptul că aceste preparate nu sunt fixate şi colorate permite examinarea unor caracteristici care ar putea fi alterate în cursul acestor procese. Se pot examina structuri citoplasmatice, morfologia celulară, dar şi structuri bacteriene sau fungice.

Microscopul cu fluorescenţă

Microscopul cu fluorescenţă trebuie să fie dotat cu următoarele piese speciale: sursa de radiaţii (de ex. o lampă din sticlă de cuarţ cu vapori de Hg care emite radiaţii ultraviolete), setul de filtre (caloric, de excitaţie, de baraj), condensatorul pentru fond întunecat.

Filtrele au următoarele roluri. Filtrul caloric absoarbe radiaţiile calorice emise de lampă (sursa de radiaţii emite atât radiaţii ultraviolete cât şi radiaţii luminoase şi calorice). Filtrele de excitaţie permit numai radiaţiilor cu lungime de undă mică (ex. ultraviolete) să acceadă către preparatul microscopic. Aceste radiaţii reprezintă radiaţii de excitaţie. Filtrele de baraj sunt de fapt filtre de protecţie pentru că nu permit trecerea radiaţiilor de excitaţie nocive să treacă spre ocular şi respectiv spre ochiul examinatorului, în timp ce lumina emisă de fluorocromi trece şi poate fi percepută. Filtrele de excitaţie şi de baraj sunt alese în funcţie de fluorocromul utilizat.

Condensatorul măreşte contrastul imaginii mai bine decât un condensator obişnuit.

Pentru examinarea în fluorescenţă mai sunt necesare câteva elemente, respectiv obiectivele acromate (cu menţiunea că obiectivul cu imersie trebuie să aibă diafragmă iris), utilizarea unui lichid de imersie care nu se usucă uşor şi este lipsit de proprietatea de fluorescenţă (ex. glicerină tamponată neutră) şi respectiv lame cu grosimea de 1 milimetru. Este preferabilă utilizarea unui dispozitiv monocular.

Examinarea folosind microscopul cu fluorescenţă

Preparatele microscopice (care pot include bacterii) sunt tratate cu flurocromi (coloranţi fluorescenţi). Fluorocromii sunt compuşi organici care, după „iradiere" cu radiaţii ultraviolete absorb radiaţia excitantă, intră în stare de excitaţie, iar atunci când revin în „starea normală" pierd energia acumulată emiţând radiaţii luminoase. Dintre fluorocromi am putea aminti auramina O, rhodamina B, acridin-oranj R sau tripaflavina. Lumina vizibilă emisă depinde de fluorocromul utilizat (spre exemplu culoarea este galbenă pentru auramina O, galben-portocalie pentru combinaţia de auramină O – rhodamină B etc).

Sunt de menţionat în mod special acele substanţe care se pot lega covalent de anticorpi, marcând astfel complexele antigen-anticorp care devin fluorescente. Atunci când marcajul se realizează cu izotiocianat de fluoresceină lumina emisă va avea culoare verde, iar dacă marcajul se realizează cu lisamin-rhodamină, lumina emisă va avea culoare portocalie.

Drept exemplu privind utilizarea microscopiei cu fluorescenţă vom menţiona examinarea frotiurilor colorate fluorescent sau imunofluorescent în diagnosticul bacteriologic al tuberculozei sau al leprei. Alte exemple vor fi prezentate în cadrul capitolului 20.

9. MEDII DE CULTURĂ

Populaţia = o multitudine de indivizi ai unei specii care habitează într-un anumit biotop. Clona reprezintă populaţia care rezultă dintr-o singură celulă prin înmulţire vegetativă. Tulpina = populaţia microbiană alcatuită din descendenţii unei singure izolări în cultură pură.

În funcţie de temperatura de dezvoltare, microorganismele pot fi mezofile, psichrofile sau termofile. Bacteriile studiate de microbiologia medicală sunt în imensa lor majoritate mezofile (au temperatura optimă de dezvoltare cuprinsă între 30-37°C). Pentru fungi, temperatura optimă de dezvoltare este în jur de 28°C.

Pentru a identifica agentul etiologic al unei infecţii trebuie ca dintr-un produs recoltat de la pacient să obţinem mai întâi respectivul microorganism în cultură pură, pentru ca ulterior să i se poată studia caracterele fenotipice sau genotipice. Cultivarea este esenţială şi pentru determinarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice.

Metodele de cultivare a bacteriilor sau fungilor urmăresc trei obiective: obţinerea unei populaţii microbiene suficiente cantitativ pentru investigaţiile propuse, prevenirea contaminării produsului cercetat cu un microorganism străin şi izolarea fiecărei tulpini microbiene urmărite în cazul unui produs plurimicrobian în culturi monomicrobiene denumite „culturi pure". Nu există un mediu unic, valabil pentru cultivarea oricărui microorganism.

Termenul „însămânţare" defineşte operaţia de introducere a unei cantităţi de germeni într-un mediu de cultură artificială, în timp ce pentru culturile celulare, ouă embrionate şi mai ales animale de experienţă folosim termenul „inoculare".

Cultivarea se realizează prin însămânţarea microorganismelor pe medii de cultură. Mediile solide sau lichide care asigură nutrienţii şi condiţiile fizico-chimice necesare creşterii şi multiplicării se numesc **medii de cultură.** Totalitatea microorganismelor acumulate prin multiplicarea într-un mediu de cultură poartă numele de **cultură (bacteriană, fungică** etc).

***

Există o foarte mare varietate de medii de cultură.

Mediile de cultură se pot clasifica după mai multe criterii. În primul rând, în funcţie de conţinutul în celule vii avem la dispoziţie:

1. Medii necelulare (artificiale, medii de cultură)

2. Medii celulare (care includ celule vii) şi anume animale de laborator, ouă de găină embrionate sau culturi de celule.

Există anumite microorganisme (ex. virusuri, *Rickettsii, Chlamydii)* care nu pot fi cultivate decât pe substraturi care includ celule vii. Majoritatea bacteriilor, fungii şi unele protozoare se pot cultiva şi pe medii de cultură (necelulare, artificiale).

Gazdele vii (medii celulare)

Animalele de experienţă

Fie în situaţia microorganismelor care nu se dezvoltă pe medii artificiale, fie în cazul în care se studiază caracterele de patogenitate, se pot utiliza în funcţie de specia microbiană şi scopul urmărit: şoarecele alb, cobaiul, şobolanul, hamsterul şi iepurele. Pentru producerea de seruri imune sunt folosiţi cai. Animalele de laborator necesită condiţii speciale de întreţinere iar biobaza trebuie să respecte o serie de norme care să garanteze calitatea acestor gazde vii. Astfel se explică costurile ridicate în ceea ce priveşte acest tip de „medii".

Având în vedere microorganismul inoculat, susceptibilitatea gazdei şi scopul urmărit se pot inocula animale cu vârste diferite (embrioni, nou-născuţi, animale tinere, adulţi) pe căi diferite de inoculare (per cutanat, prin scarificare, subcutanat, instilare la nivelul anumitor mucoase, per os, intramuscular, intravenos, intratesticular etc).

Aşa cum, spre exemplu, virulenţa *Mycobacterium tuberculosis* scade pe măsură ce microorganismul este cultivat pe anumite medii de cultură (aspect dovedit şi prin obţinerea tulpinii vaccinale BCG de *M. tuberculosis* varianta *bovis),* în sens invers, este necesară uneori exacerbarea virulenţei, prin pasaje repetate realizate pe gazde susceptibile. Alte exemple pot fi discutate în raport cu *Streptococcus pneumoniae, Shigella spp., Klebsiella pneumoniae, Treponema pallidum, Rickettsia spp., Chlamydia spp* şi *Candida spp.*

Oul de găină embrionat

Are avantajul unui preţ mai scăzut, este în mod normal steril (în condiţiile producerii acestor „gazde vii" în unităţi specializate), nu prezintă factori antimicrobieni în perioada în care se realizează în mod obişnuit inocularea (la 6-14 zile de incubaţie).

Oul de găină este întâi examinat la ovoscop pentru evaluarea embrionului şi prezenţei unor eventuale modificări nedorite. În condiţii de strictă asepsie oul de găină embrionat se poate inocula intraembrionar (intramuscular, intracerebral etc), la nivelul membranei chorioalantoidiană, în sacul alantoidian sau în sacul amniotic. Oul inoculat se introduce în incubator, la 37°C în condiţii de bună ventilaţie a aerului şi umiditate corespunzătoare, pentru 1 sau mai multe zile. Se poate utiliza această metodă pentru izolarea şi identificarea tulpinilor rickettsiene (utilizând metode imunologice, ex. reacţia de microaglutinare).

Culturi de celule

Există posibilitatea utilizării unor culturi de organ sau a culturilor de celule dispersate. Acestea din urmă se pot clasifica în culturi primare, tulpini celulare şi linii celulare.

Culturile primare derivă din dispersia enzimatică (de ex. cu tripsină-EDTA) a celulelor unui organ proaspăt recoltat şi pot fi menţinute in vitro pentru 3-5 pasaje. Tulpinile celulare reprezintă culturi cu un singur tip de celule (culturi omogene) şi pot fi menţinute in vitro pentru 50-60 pasaje. Liniile celulare continue (stabile) sunt populaţii celulare care derivă din ţesut normal sau malign şi pot fi subcultivate (respectând indicaţiile din protocol) în mod nelimitat. Au fost puse la punct foarte multe linii celulare spre exemplu:

- linii celulare derivate din rinichi de maimuţă (Vero, BSC-1, BGMK etc), şoarece (McCoy), ovar de hamster (CHO);
- linii celulare derivate din carcinom de col uterin (HeLa), laringe (HEp-2);
- linii celulare limfoblastoide (MT-4, H9 etc) etc.

Pentru *Chlamydia trachomatis* se pot utiliza liniile celulare BGMK, HeLa, McCoy, pentru *Chlamydia pneumoniae* se pot utilizat liniile celulare HeLa, HEp-2, pentru *Chlamydia psittaci* se poate utiliza linia celulară McCoy etc. Liniile celulare pot fi utile şi în vederea studierii efectului unor exotoxine, spre exemplu în cazul toxinelor produse de *E. coli* O157:H7 şi respectiv de *Shigella shiga* se poate utiliza linia celulară Vero în timp ce pentru toxinele produse de *Vibrio cholerae* şi *E. coli* entero-toxigen se poate utiliza linia celulară CHO.

Medii artificiale (necelulare)

Mediile de cultură artificiale sunt mai ieftine, se pot prepara mai uşor (folosind reţete foarte asemănătoare celor „de bucătărie" sau alte variante despre care vom discuta pe scurt în continuare) şi, fără a fi „ideale", sunt cel mai frecvent utilizate în practicat microbiologică.

Condiţii impuse mediilor de cultură artificiale:

- să fie sterile,
- să fie nutritive (să conţină factorii de creştere necesari),
- să aibă un anumit pH (cel mai adesea între 7,2-7,6),
- să aibă o anumită presiune osmotică,
- să aibă umiditatea favorabilă multiplicării germenilor
- alte condiţii.

Clasificarea mediilor de cultură artificiale

Mediile de cultură artificiale se pot clasifica după o serie de criterii.

- după starea de agregare, mediile de cultură artificiale pot fi:
  - solide (agar/geloză, agar-sânge, AABTL, ADCL, Bordet-Gengou, Chapman, Löffler, Löwenstein, Mueller-Hinton, Sabouraud, TCBS, TSI etc)
  - lichide (apă peptonată alcalină, bulion Mueller-Hinton, bulion nutritiv, bulion-sânge, bulion selenit, bulion tioglicolat, Middlebrook 7H9, OCST etc)
  - semisolide (Cary-Blair, MIU, Stuart etc)
- după complexitatea ingredientelor, mediile pot fi:
  - simple (agar, bulion simplu etc)
  - complexe (agar-sânge, geloză-chocolat, agar cu factori X şi V, Bordet-Gengou, Mueller-Hinton etc)
- după scopul urmărit mediile de cultură artificiale pot fi:
  - de transport (apă peptonată alcalină, Cary-Blair, Stuart etc)
  - de izolare (agar-sânge, Bordet-Gengou, Löffler, Löwenstein, Sabouraud etc)
  - de identificare (TSI, MIU, truse API etc)
  - de conservare (agar nutritiv în coloană etc)
- după conţinutul în apă, mediile pot fi:
  - cu umiditate obişnuită
  - medii uscate (deshidratate)
- medii speciale:
  - elective (Löffler etc)
  - selective (agar-sânge azid de sodiu, BSA, Chapman, Mac Conkey, Tinsdale cu telurit de potasiu, medii cu antibiotice etc)
  - de îmbogăţire (apă peptonată alcalină, bulion selenit, OCST etc)
  - diferenţiale (AABTL, ADCL, agar-sânge, MIU, TSI, TCBS etc):
- există şi alte criterii de clasificare.

Mediul electiv conţine ingredientele care convin cel mai bine dezvoltării unei anumite bacterii (de exemplu mediul Lõffler, cu ser coagulat de bou, pentru bacilul difteric).

Prin conţinutul său în substanţe antimicrobiene, **mediul selectiv** inhibă dezvoltarea altor bacterii decât cea a cărei izolare se urmăreşte. De exemplu, mediul cu telurit de potasiu pentru izolarea bacilului difteric sau medii în care includem antibiotice (faţă de care bacteria care se doreşte a fi izolată este rezistentă).

Mediul de îmbogăţire favorizează înmulţirea anumitor bacterii patogene, inhibând dezvoltarea florei de asociaţie dintr-un produs patologic. Funcţionează concomitent ca mediu selectiv şi ca mediu electiv.

Mediul diferenţial conţine un indicator de pH şi un anumit substrat (de exemplu un zahar) care poate fi sau nu metabolizat, determinând modificarea pH-ului şi a culorii indicatorului sau modificarea aspectului culturii. De exemplu, agarul cu

albastru de brom-timol lactozat (AABTL) permite diferenţierea bacteriilor lactozo-pozitive (cum este *E. coli)* de bacteriile lactozo negative *(Shigella, Salmonella* etc). Alte exemple: ADCL (agar dezoxicolat citrat lactoză), TSI (3 zaharuri şi fier), MIU (mobilitate indol uree).

Iniţial, toate mediile de cultură erau preparate în laborator, din ingredientele stabilite conform reţetei. Etapele generale pentru producerea unui mediu sunt asemănătoare:

- cântărirea ingredientelor;
- dizolvarea în apă distilată sau apă deionizată;
- verificarea pH-ului şi ajustarea la pH-ul corect;
- filtrarea;
- sterilizarea (de regulă prin autoclavare);
- repartizarea în tuburi, flacoane etc.

În momentul de faţă foarte frecvent se recurge la cumpărare de medii deshidratate, situaţie în care este necesară doar adăugarea apei distilate, demineralizate sau distilate şi demineralizate (conform recomandărilor producătorului), condiţionarea şi sterilizarea prin autoclavare sau metoda recomandată pentru mediul respectiv.

Există de asemenea medii gata pentru utilizare, condiţionate în plăci Petri sau tuburi.

Indiferent de forma de condiţionare a mediilor de cultură precum şi indiferent de modul de procurare al acestora, laboratorul care le utilizează trebuie să le supună **controlului de calitate.**

Spre exemplu, pentru a testa sterilitatea mediului agar-sânge, incubăm 2 plăci la 37°C timp de 48 de ore; nu trebuie să apară modificări macroscopice. Pentru a testa performanţa mediului (eficienţa biologică) utilizăm o altă placă. Pe câte o jumătate de placă vom cultiva o tulpină de colecţie de *Streptococcus pyogenes* şi respectiv o tulpină de colecţie *Streptococcus pneumoniae;* incubăm placa Petri pentru 18-24 ore la 35-37°C şi apoi analizăm dezvoltarea culturii, caracterele coloniilor şi respectiv caracterele hemolizei produse.

În general, mediile de cultură după producere şi până în momentul utilizării sunt conservate la adăpost de lumina solară, +4°C, în folie de plastic închisă ermetic. Mediile pentru anaerobi (bulion tioglicolat, alte medii) se păstrează în dulapuri, la întuneric şi temperatura camerei.

Descriere succintă pentru unele medii mai frecvent folosite

Agar-sânge

Include agar nutritiv bază care se dizolvă la temperatură ridicată şi prin agitare în apă distilată; autoclavăm (15 minute la 121°C) şi apoi răcim până la 50°C. La

această temperatură adaugăm în proporţie de 5% sângele defibrinat (sânge de berbec, cal, bou sau de iepure; sângele de om ar putea fi utilizat numai dacă nu există o altă posibilitate, folosind de exemplu sânge care a depăşit limita de valabilitate într-o bancă de sânge). Distribuim mediul în condiţii aseptice, în plăci Petri. Poate fi menţinut la +4°C până la 4 săptămâni.

Agar-chocolat

Procedăm ca mai sus, până la obţinerea amestecului de agar-sânge. Introducem flaconul cu mediu în baie de apă şi menţinem timp de 10 minute la 80°C; astfel eritrocitele vor elibera factorii nutritivi necesari dezvoltării unor bacterii mai pretenţioase din punct de vedere nutritiv. Când temperatura revine la 50°C turnăm mediul în plăci Petri. Se poate conserva la temperatura frigiderului pentru nu mai mult de 4 săptămâni.

Amies

Include agar, tioglicolat de sodiu, cărbune farmaceutic neutru (pentru a facilita supravieţuirea microorganismelor fragile, de ex. *Neisseria gonorrhoeae)* şi o soluţie tamponată de săruri anorganice. Nu conţine indicator redox. Este sterilizat prin autoclavare şi poate fi menţinut la +4°C timp de 12 luni.

Este un mediu de transport care limitează şi multiplicarea unor eventuali coliformi de contaminare (ceea ce nu se realizează prin folosirea mediului Stuart).

Apă peptonată alcalină

Este un mediu utilizat pentru transportul probelor în care se suspectează prezenţa *Vibrio cholerae.* Include peptonă şi clorură de sodiu dizolvate prin încălzire în apă distilată, cu ajustarea pH-ului la o valoare de 8,6-9,0. Mediul este repartizat în tuburi. Sterilizăm prin autoclavare (15 minute, 121°C). Valabilitatea este de circa 6 luni (la temperatura de 4°C).

Bulion selenit

Este un mediu de îmbogăţire, utilizat pentru izolarea *Salmonella spp.* Include printre alte componente selenit acid de sodiu. Datorită riscurilor acest mediu nu va fi pregătit de femei însărcinate, iar cei care îl produc vor avea grijă să nu inhaleze sau înghită această substanţă. Sterilizarea mediului turnat în tuburi se face în baia de apă la temperatura de fierbere şi nu prin autoclavare. Se poate conserva la temperatura frigiderului timp de 6 luni.

Cary-Blair

Include agar, tioglicolat de sodiu şi o soluţie tamponată de săruri anorganice dizolvate (prin încălzire şi agitare) în apă distilată. Este sterilizat prin autoclavare şi poate fi conservat la temperatura frigiderului mai multe luni.

Cary-Blair este un mediu de transport în special pentru germeni gram negativi.

Löwenstein-Jensen

Reprezintă mediul clasic utilizat în mycobacteriologie. Include 3 componente principale: o soluţie de săruri şi amidon, soluţia de verde malachit şi omogenizatul de ouă (proaspete şi bine antiseptizate). După filtrare produsul se repartizează în tuburi (cu capac înşurubat, ţinând cont de timpul lung de incubare, 2-8 săptămâni). Mediul este coagulat în pantă, la 85°C şi după răcire se poate menţine la temperatura frigiderului câteva luni, până la utilizare.

Mac Conkey

Este un mediu slab selectivo-diferenţial care include hidrolizat de gelatină, hidrolizat de cazeină, lactoză, săruri biliare, clorură de sodiu, roşu neutru (indicator de pH), cristal violet şi agar, dizolvate în apă distilată şi autoclavate timp de 15 minute la 121°C. Poate fi menţinut la +4°C până la 4 săptămâni.

Medii pentru anaerobi

Există mai multe tehnici pentru a asigura condiţiile de anaerobioză. Relativ frecvent se utilizează montarea plăcii Petri, care conţine deja mediul de cultură răcit şi însămânţat, răsturnată pe capacul propriu, pe care se găseşte un pliculeţ care conţine amestec reducător (pirogalol, talc, carbonat de potasiu). Utilizăm parafină încălzită pentru a etanşeiza placa. După solidificarea parafinei, mediul de cultură este incubat în vederea obţinerii coloniilor.

Medii pentru fungi

Vom discuta pe scurt doar un mediu mai frecvent utilizat, respectiv mediul Sabouraud. Acesta include glucoză, digestie pancreatică de cazeină şi agar care se dizolvă prin uşoară agitare, la cald, în apă distilată. După ajustarea pH-ului la 5,6 urmează fierberea şi filtrarea mediului, la cald. Apoi are loc repartizarea în plăci Petri sau în tuburi şi acestea se autoclavează timp de 15 minute la 121°C. Înainte de utilizare, plăcile cu mediu Sabouraud pot fi stocate la temperatura frigiderului pentru circa 2 luni. De multe ori acest mediu devine selectiv prin adăugare de antibiotice (cloramfenicol, gentamincină etc).

Despre mediile multitest TSI (triple sugar iron) şi MIU (mobilitate indol uree) vom discuta în cadrul capitolelor 12 şi 28.

Stuart

Include agar, tioglicolat de sodiu, glicerofosfat de sodiu, clorură de calciu şi albastru de metilen, dizolvate prin încălzire la temperatura de fierbere în apă distilată. Este sterilizat prin autoclavare şi poate fi menţinut la +4°C timp de 2-3 luni.

Este un mediu de transport universal; bacteriile pot supravieţui 1-3 zile.

10. TEHNICI DE CULTIVARE

Tehnicile de cultivare se folosesc pentru obţinerea de colonii izolate prin însămânţarea produsului patologic pe medii solide şi pentru repicarea coloniilor izolate în vederea obţinerii de cultură pură, precum şi în alte situaţii.

Pentru a corela noţiunile pe care le vom prezenta cu ceea ce a fost prezentat în capitolele anterioare, facem următoarele menţiuni:

- în capitolul 5 am discutat schema generală a diagnosticului microbiologic;
- acest diagnostic nu poate fi realizat în lipsa cunoştinţelor privind
  - conduita în laborator şi a normelor de protecţie a muncii (capitolul 2);
  - echipamentul şi aparatura necesare (capitolul 3);
  - dezinfecţia şi sterilizarea (capitolul 4).

Toate acestea trebuie înţelese în contextul unei activităţi care să prevină erorile, să realizeze protecţia pacienţilor, să permită compararea rezultatelor la nivel naţional şi internaţional, să contribuie la realizarea unei standardizări în microbiologia clinică românească şi să crească încrederea tuturor partenerilor din sistemul sanitar din ţara noastră (capitolul 1).

Pornind de la aceste noţiuni de bază, în capitolele următoare am discutat:

- prima etapă a diagnosticului direct (bacteriologic sau micologic), în capitolul 6;
- utilizarea examenului microscopic în a doua şi respectiv în a patra etapă (de identificare) a diagnosticului direct (capitolele 7 şi 8);
- substraturile pe care se poate realiza a treia şi respectiv a patra etapă (câteva dintre caracterele examinate), în capitolul 9.

În capitolul de faţă vom avea în vedere o parte dintre tehnicile indispensabile diagnosticului microbiologic în general, subliniind utilizarea acestora în a treia şi a patra etapă de diagnostic.

În capitolele următoare (11-13) vom prezenta o parte din elementele care definesc complexitatea etapei de identificare a microorganismelor, iar în capitolul 14 vom discuta o parte dintre modalităţile de stabilire a sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice (antibacteriene sau antifungice) cu ajutorul cărora, după încheierea unui diagnostic corect microbiologic, putem stabili în mod ştiinţific tratamentul antimicrobian ce trebuie prescris unui anumit pacient care prezintă o boală infecţioasă de etiologie bacteriană sau fungică.

Aşa cum am menţionat şi în capitolul 9, tehnicile de cultivare urmăresc trei obiective:

- obţinerea unei populaţii microbiene suficiente cantitativ pentru scopul propus;
- prevenirea contaminării produsului cercetat cu alte microorganisme şi
- izolarea fiecărei tulpini microbiene urmărite în cazul unui produs plurimicrobian în culturi monomicrobiene denumite „culturi pure".

Nu există un mediu unic, valabil pentru cultivarea oricărui microorganism.

Este esenţial să se înţeleagă necesitatea obţinerii coloniilor izolate precum şi a culturilor pure în diagnosticul de laborator bacteriologic şi micologic (direct). În cazul în care coloniile izolate reprezintă o cultură pură (formată din acelaşi tip de microorganism), aceasta va fi utilizată în vederea identificării agentului etiologic (bacteria izolată de la un pacient cu o presupusă boală infecţioasă) precum şi la efectuarea antibiogramei în vederea stabilirii tratamentului „ţintit" (antibioticul la care bacteria izolată este sensibilă). În situaţia în care nu s-a reuşit obţinerea culturii pure, pornind de la coloniile obţinute se vor face repicări pe medii de cultură neselective.

Obţinerea de colonii bacteriene izolate dintr-un produs patologic se poate realiza prin epuizarea inoculului pe mediile de cultură folosind:

- ansa bacteriologică;
- pipeta Pasteur;
- tamponul de vată montat pe o tijă;
- bagheta de sticlă în formă de „L";
- alte tehnici de însămânţare.

Ansa bacteriologică trebuie sterilizată înainte şi după fiecare utilizare a sa prin încălzirea până la incandescenţă („la roşu") a buclei şi firului urmată de flambarea portansei, pe când celelalte ustensile pentru însămânţare vor fi sterilizate prin alte metode (vezi capitolul 4).

Obţinerea coloniilor izolate prin epuizarea inoculului cu ansa bacteriologică

Însămânţarea „în pentagon deschis" a mediului solid aflat într-o placă Petri folosind ansa bacteriologică, pentru obţinerea de colonii bacteriene izolate, pornind de la un produs patologic recoltat şi transportat către laborator într-o eprubetă/tub închis cu dop de vată include următoarele etape:

- **atenţie**: toate activităţile se desfăşoară în stricta vecinătate a becului de gaz!
- **atenţie**: pe suprafaţa mediului de cultură poate exista lichid de condens care ar putea facilita contaminarea culturii bacteriene; este necesar ca placa Petri cu mediu de cultură pe care dorim să facem cultivarea să fie menţi-

nută în termostat, cu mediul în sus, întredeschisă, pentru evaporarea condensului!

- se sterilizează ansa bacteriologică la flacăra becului de gaz prin aducerea la incandescenţă a buclei şi firului ansei urmat de flambarea portansei (trecere prin flacără de 2-3 ori);
- se notează pe placa cu mediu de cultură data inoculării, numărul de identificare şi tipul produsului (tipul produsului poate fi inclus printr-un simbol în numărul unic de identificare);
- se ia eprubeta cu produs patologic în mâna stângă (în cazul în care fiind dreptaci ansa bacteriologică este ţinută în mâna dreaptă, ca un creion), se scoate dopul eprubetei utilizând în acest scop degetele 4-5 de la mâna dreaptă;
  - **atenţie**: să nu se scape dopul din mână = pericol de contaminare a mesei de lucru!
  - **atenţie**: dopul nu trebuie strâns în podul palmei = pericol de contaminare!
- se flambează gura eprubetei (trecere prin flacără de 2-3 ori, imprimând o uşoară mişcare de rotire în ambele sensuri);
- se introduce ansa în eprubetă fără să se atingă gura sau pereţii acesteia în partea superioară, se răceşte bucla pe pereţii eprubetei în vecinătatea produsului patologic şi se încarcă bucla ansei din profunzimea produsului patologic, recoltând fragmente care ar putea include cu o mai mare probabilitate bacterii implicate în procesul infecţios (ex. porţiuni cu aspect purulent);
- se scoate ansa fără sa atingem pereţii sau gura eprubetei;
  - **atenţie**: contaminarea pereţilor eprubetei în porţiunea în care se va „monta" dopul, va duce la contaminarea dopului şi respectiv la o mare probabilitate de contaminarea a celui care va utiliza ulterior eprubeta/tubul cu produs patologic!
- se flambează gura eprubetei;
- se montează dopul la eprubetă printr-o mişcare de răsucire ce are ca scop fixarea lui;
  - **atenţie**: gura eprubetei poate fi fierbinte după flambare!
  - **atenţie**: în toată această perioadă se contraindică efectuarea unor mişcări bruşte cu ansa încărcată cu produs patologic; mişcările bruşte şi necontrolate pot determina contaminarea cu produs patologic a mesei de lucru, a mediului de lucru sau a celui care manipulează produsul patologic!
- după ce eprubeta a fost aşezată în stativ, mâna stângă eliberată va lua o placă Petri pe care o va aşeza pe masă cu capacul în jos şi mediul în sus;
- tot cu mâna stângă se va deschide placa iar cu ansa încărcată cu produs pato-

logic se vor trasa linii (striuri) aproximativ paralele între ele, ca un „zig-zag" (fără a se ridica ansa de pe mediul de cultură) reprezentând o primă latură a unui pentagon deschis;

- se închide placa Petri;
- ansa se sterilizează la flacără, portansa se flambează;
- se răceşte ansa (se poate încerca răcirea ei prin atingere pe suprafaţa mediului solid steril, neînsămânţat, lângă peretele exterior al plăcii Petri);
- fără să se mai încarce ansa cu produs patologic se trasează a doua latură a pentagonului intersectând-o pe prima, tot ca „liniile paralele", după care ansa se va steriliza din nou;
- se va proceda la fel ca mai sus şi pentru următoarele laturi având grijă să nu se unească ultima latură cu prima latură
  - în momentul intersectării cu ansa a laturii precedente a poligonului, ansa este „reîncărcată" cu microorganisme, dar în „cantitate" din ce în ce mai mică, până ce se va ajunge la câteva celule microbiene izolate care, diseminate pe placă vor da naştere la colonii microbiene izolate
- se introduce placa Petri pe care a fost realizată cultivarea în termostat, răsturnată (cu mediul în sus şi capacul în jos), la temperatura optimă multiplicării microorganismului suspectat (pentru cele mai multe bacterii termostatul va fi reglat pentru o temperatură de 35-37°C, pentru fungi la 28°C);
- după o perioadă de incubare de 18-24 ore (pentru cele mai multe dintre microorganismele studiate), pe prima latură se va obţine cea mai importantă cantitate de cultură (cultură microbiană confluentă), pe următoarele laturi se va remarca „scăderea cantitativă" a culturii iar cel puţin pe ultima latură a „pentagonului deschis" se vor obţine colonii izolate.

Dacă mediul de cultură pe care s-a realizat cultivarea „în pentagon deschis" este neselectiv, coloniile izolate obţinute pot fi utilizate în etapele ulterioare (identificare prin diferite metode, testarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice). În cazul în care cultura primară este obţinută pe un mediu selectiv, este obligatorie repicarea coloniilor izolate deoarece coloniile izolate vizibile pot fi asociate cu microorganisme inhibate datorită selectivităţii mediului, care nu se văd cu ochiul liber sau cu lupa şi care se vor multiplica pe mediile de identificare făcând imposibilă interpretarea rezultatelor.

Tehnica descrisă este o tehnică de bază şi cu anumite modificări se poate utiliza şi în alte situaţii (spre exemplu atunci când produsul patologic este recoltat în alte tipuri de recipiente).

Alte tehnici de cultivare (însămânțare)

Am ales pentru o prezentare amănunțită tehnica obținerii coloniilor izolate prin epuizarea inoculului cu ansa bacteriologică (însămânțarea „în pentagon deschis") deoarece considerăm că această reprezintă o tehnică esențială, care poate fi reținută încă din al doilea an de studiu). În continuare vom prezenta alte tehnici de cultivare, fără a epuiza toate variantele posibile.

Însămânțarea cu ansa calibrată

- se poate utiliza pentru urocultura și în alte scopuri în care aproximarea numărului de microorganisme dezvoltate pe mediul de cultură este utilă;
- putem utiliza anse de platină sau anse de unică folosință pentru 0,01 sau pentru 0,001 ml/calibrul anselor de platină trebuie verificat în fiecare lună;
- urina recoltată corespunzător (vezi capitolele 6 și 29) se omogenizează prin răsturnarea de câteva ori a recipientului de recoltare (închis etanș);
- respectând regulile lucrului aseptic, înclinăm recipientul de colectare în așa fel încât să putem să punem bucla ansei, paralel pe suprafața urinei și să prelevăm p.p.;
- pe o placă Petri cu mediul de cultură se descarcă urina în striu, pe unul dintre diametre; apoi epuizăm inoculul pe toată suprafața plăcii în striuri perpendiculare pe striul „de descărcare", cu mișcări de zig-zag;
- după incubare, în ziua următoare vom număra coloniile apărute și spre exemplu vom înmulți numărul de colonii cu 1000 dacă am utilizat pentru însămânțare ansa de 0,001 ml;
- din motive economice putem să realizăm însămânțarea în mod asemănător a urinei pe o jumătate sau chiar pe o pătrime de placă.

Însămânțarea cu tamponul sau cu bagheta de sticlă în "L"

- aceste tehnici se pot folosi atât pornind de la produs patologic (metodă preferată în unele laboratoare) cât și de la colonii care sunt utilizate pentru obținerea de cultură pură;
- însămânțarea cu tamponul poate fi folosită și pentru realizarea antibiogramei difuzimetrice;
- vom prezenta în continuare varianta în care se utilizează tamponul pentru cultivarea unui produs patologic (exsudat faringian etc), presupunând că suntem dreptaci
  - notăm pe placa cu mediu de cultură data inoculării, numărul de identificare și tipul produsului (tipul produsului poate fi inclus printr-un simbol în numărul unic de identificare) – nu vom mai nota această etapă la prezentarea următoarelor tehnici dar menționăm acum faptul că este obligatorie, de

fiecare dată; alte lucruri cu importanţă generală, menţionate la tehnica obţinerii coloniilor izolate prin epuizarea inoculului cu ansa bacteriologică rămân valabile;

- scoatem tamponul din tubul protector cu primele trei degete de la mâna dreaptă;
- flambăm gura tubului protector şi îl aşezăm pe un stativ;
- cu mâna stângă luăm o placă Petri (care nu mai prezintă lichid de condens interior) pe care o aşezăm pe masă cu capacul în jos şi mediul în sus;
- tot cu mâna stângă deschidem placa iar cu dreapta descărcăm tamponul încărcat cu produs patologic (există mai multe modalităţi de descărcare a tamponului, dintre care vom prezenta două).

- descărcăm tamponul prin rulare, pe toate feţele pe o rază a plăcii, urmând ca să dispersăm produsul cu o baghetă de sticlă în „L", sterilă, pe toată suprafaţa plăcii;
- descărcăm tamponul prin rulare, pe toate feţele pe un cadran al plăcii, urmând ca să dispersăm produsul cu ansa bacteriologică în celelalte cadrane, ca în metoda „pentagonului deschis" (după însuşirea tehnicii, pentru economie, se poate realiza cultivarea pe jumătatea unei plăci).

Tehnica diluţiilor succesive în lichidul de condens al mediilor solide

- mediul de cultură este turnat în eprubete sau tuburi; utilizăm mai multe eprubete;
- prelevăm cu ansa p.p. şi îl descărcăm în picătura de lichid de condens al primului tub;
- fără să încărcăm din nou ansa cu p.p. o descărcăm în picătura de condens a celui de al doilea tub ş.a.m.d;
- după însămânţare, înclinăm eprubetele pentru a „scălda" suprafaţa mediului înclinat, cu picătura respectivă de lichid de condens, realizând în acest mod dispersia microorganismelor din picătura de inocul, pe suprafaţa mediului.

Tehnica epuizării ansei pe medii solide

- constă în efectuarea unei serii de însămânţări cu ansa bacteriologică încărcată o singură dată cu amestecul de microorganisme, într-un şir de eprubete cu geloză înclinată, fără a steriliza sau a reîncărca ansa bacteriologică pe parcurs
- însămânţăm pornind de la baza eprubetei, atingând mediul şi „urcând" prin descrierea unor striuri în zig-zag, pentru fiecare eprubetă în parte
- realizăm astfel o „epuizare" a conţinutului ansei, în final, ajungând să însămânţăm numai câteva celule microbiene, din care vor apărea după incubare colonii izolate.

Însămânţarea prin înţepare a mediului turnat în tuburi sau eprubete

- metoda se poate utiliza pentru conservarea culturilor pure ale unor tulpini considerate reprezentative, a tulpinilor de colecţie, a tulpinilor de referinţă, pentru însămânţarea unor medii multitest (TSI, MIU etc) etc;
- se preferă utilizarea unei anse fir, sau a unei anse cu o buclă mică (după caz);
- în funcţie de scopul urmărit există anumite variante ale acestei tehnici, iar tuburile (eprubetele) utilizate au dimensiuni diferite şi o cantitate de mediu care diferă (respectând protocolul de lucru corespunzător);
- spre exemplu în cazul însămânţării mediului TSI
  - se utilizează tuburi de dimensiuni mici, cantitatea de mediu utilizată pentru un tub fiind de 3 ml;
  - iniţial se însămânţează partea „dreaptă" prin înţepare, fără a se atinge baza tubului;
  - ulterior se însămânţează partea „înclinată" prin realizarea unor striuri în zig-zag, atingând suprafaţa mediului.

Însămânţarea cu seringa

- produsele lichide (în special sânge pentru hemocultură dar şi alte p.p.) se pot însămânţa direct cu seringa cu care s-a făcut recoltarea.

Însămânţarea cu pipeta (Pasteur sau pipeta gradată, după caz)

- la deschiderea şi închiderea recipientelor flambăm gura fiecăruia în parte, aşa cum am prezentat mai sus;
- înainte de a folosi pipeta, deşi sterilizată în prealabil, o vom flamba prin trecere pe aproape toată lungimea prin flacără;
- pentru a preleva p.p. din recipientul de transport precum şi pentru însămânţare în mediul lichid sau solid, folosim un pipetor cât de simplu (este contraindicată aspirarea cu gura);
- după încheierea însămânţării eliminăm lichidul rămas eventual în pipetă în flaconul cu amestec sulfo-cromic, introducem pipeta în amestecul sulfo-cromic şi aspirăm soluţia dezinfectantă până aproape de dopul de vată al pipetei;
- toate pipetările se realizează cu ajutorul dispozitivului adaptat la pipetă;
- pipeta va fi menţinută timp de 24 ore în amestecul sulfo-cromic.

Însămânţarea cu pipeta, prin „inundare"

- reprezintă o variantă a tehnicii prezentate mai sus;

- se poate folosi pentru depunerea inoculului în vederea realizării antibiogramei difuzimetrice, pentru verificarea sensibilităţii la bacteriofag (lizotipie) etc;
- după încărcarea pipetei cu cultura pură, inoculul se descarcă pe suprafaţa mediului solid din placa Petri, apoi se înclină în mod repetat placa pentru însămânţarea uniformă a suprafeţei mediului;
- excesul de inocul se aspiră cu pipeta Pasteur şi se descarcă în soluţia dezinfectantă;
- placa se lasă apoi lângă flacără pentru uscare, cu capacul întredeschis.

Tehnica diluţiilor succesive în medii lichide

- poate fi folosită pentru diluare unor suspensii antigenice, seruri, fagi etc;
- în acest scop folosim un şir de eprubete; în toate eprubetele repartizăm cu aceeaşi pipetă o cantitate constantă soluţie salină fiziologică (ex. 0,9 ml în fiecare eprubetă);
  - pipetele gradate sterile şi împachetate în hârtie se desfac în momentul utilizării în modul următor: rupem hârtia chiar la mijlocul pipetei, printr-o mişcare de răsucire în sens opus a celor două mâini; tragem partea de hârtie care se termină cu un capăt răsucit liber (corespunde porţiunii superioare a pipetei), de care vom ţine pipeta în timpul lucrului; scoatem a doua jumătate a hârtiei fără a atinge partea efilată a pipetei şi astfel pipeta rămâne sterilă pentru lucru;
- cu o altă pipetă prelevăm 0,1 ml din cantitatea de suspensie microbiană şi introducem inoculul în prima eprubetă; aspirăm şi eliminăm lichidul din pipetă de câteva ori pentru omogenizarea suspensiei; apoi punem pipeta se pune în amestec sulfocromic;
- luăm o nouă pipetă cu care aspirăm 0,1 ml lichid din tubul 1 şi introducem acest lichid în tubul 2, aşa cum am menţionat mai sus; schimbăm pipeta şi repetăm manevra până la ultimul tub; din ultimul tub scoatem 0,1 ml pe care îi eliminăm în amestecul dezinfectant.

Câteva tehnici de izolare speciale

1. Metode fizice

- încălzirea în baie de apă, timp de 10 minute la 80°C a p.p. recoltat în mod corespunzător şi suspensionat în bulion VF (mediu anaerob) din care se doreşte izolarea unor germenii sporulaţi anaerobi.

2. Metode chimice

- utilizarea mediilor selective sau a mediilor de îmbogăţire.

- adăugarea la 1 ml de p.p. recoltat în mod corespunzător (şi suspensionat în bulion VF) a 1 ml de alcool etilic de 95° urmată de agitarea tubului timp de o oră la temperatura camerei; produsul rezultat se însămânţează pe medii anaerobe, de exemplu pentru izolarea unor germeni sporulaţi.

3. Metode biologice

- inocularea sputei în care se suspectează prezenţa *S. pneumoniae* la şoarecele alb;
- după 1-4 zile de la inoculare, şoarecele face o infecţie septicemică cu pneumococ;
- se poate izola o cultură pură de pneumococ din sânge, cord, splină, ficat etc.

Aplicarea acestor tehnici va fi discutată în capitolelor următoare, iar unele dintre tehnici vor putea fi executate sau prezentate demonstrativ în cadrul lucrărilor practice.

BCU IAŞI/CENTRALUNIVERSITY LIBRARY

11. EXAMINAREA CARACTERELOR DE CULTURĂ, METABOLICE PRECUM ŞI A ALTOR CARACTERE FENOTIPICE UTILE ÎN IDENTIFICAREA MICROORGANISMELOR

În capitolul 5 am prezentat „Schema generală a diagnosticului de laborator microbiologic" şi pe această schemă am încercat să „evoluăm", adăugând treptat noi date teoretice şi practice. În acest capitol vom continua discutarea celei de a 4-a etape a diagnosticului direct (care include şi verificarea din punct de vedere microscopic a coloniilor izolate), strict necesară pentru identificarea microorganismelor izolate de la pacienţii cu boli transmisibile.

Iniţial vom relua câteva definiţii şi elemente teoretice urmând ca mai departe să prezentăm principalele caractere studiate în unele dintre sub-etapele acestui moment diagnostic, mai precis caracterele de cultură, câteva noţiuni privind caracterele biochimice, metabolice, de patogenitate; în cursul lucrărilor practice se va discuta şi despre alte caractere microbiene.

Definiţii şi alte aspecte teoretice

Colonia izolată

Pe medii solide, germenii însămânţaţi în suprafaţă produc colonii. Colonia este totalitatea bacteriilor rezultate din multiplicarea unei singure celule bacteriene. O colonie este o clonă bacteriană. Coloniile izolate se pot obţine de exemplu prin tehnica însămânţării prin dispersie (cu ansa bacteriologică sau cu tamponul), aşa cum a fost prezentat în capitolul 10.

Incubarea constă în menţinerea mediilor de cultură însămânţate, în condiţiile necesare pentru dezvoltarea culturii. Majoritatea speciilor bacteriene se dezvoltă şi duc la apariţia unei culturi în circa 18-24 de ore de incubare la temperatura optimă de dezvoltare asigurată în termostat (de regulă 35-37°C). Pentru bacteriile care necesită o atmosferă de 3-5% CO_2 (carboxifile), plăcile cultivate se vor pune în exsicator, împreună cu o lumânare aprinsă. Pentru bacteriile strict anaerobe este necesară incubarea în anaerobioză. O mare parte dintre fungi, în special levuri, au temperatura optimă de dezvoltarea în jurul a 28-30°C.

Dezvoltarea microorganismelor pe medii de cultură poate permite evaluarea anumitor aspecte macroscopice sau microscopice (ex. coloniile produse de *Mycoplasma spp.)* care pot reprezenta, după caz, modalităţi de identificare sau de orientare în alegerea algoritmului de identificare. Caracterele de cultură includ:

- necesităţile specifice în vederea cultivării;
- bacterii nepretenţioase (care se pot cultiva pe medii simple ex. *E. coli)*

- bacterii pretenţioase (care necesită medii complexe, îmbogăţite sau/şi adăugarea în medii a unor factori de creştere ex. *Haemophilus influenzae);*
- bacterii strict aerobe *(Bordetella pertussis),* aerobe facultativ anaerobe *(E. coli, S. aureus, S. pyogenes* etc), carboxifile *(S. pneumoniae* etc), microaerofile *(Campylobacter spp.,* etc), strict anaerobe *(Clostridium spp.);*
- temperatura optimă de cultivare (20-30°C pentru *Listeria monocytogenes,* 42°C pentru *Campylobacter jejuni,* 35-37°C pentru majoritatea bacteriilor, 28-30°C pentru unele levuri etc);

- intervalul de timp pentru apariţia coloniilor izolate, în funcţie de timpul de generaţie;
  - 18-24 ore pentru majoritatea bacteriilor;
  - 24-48 ore pentru majoritatea fungilor;
  - săptămâni pentru *Mycobacterium tuberculosis* etc;
- aspectul, consistenţa şi aderenţa coloniilor/culturii;
- modificările apărute pe mediu în vecinătatea coloniilor/culturii etc.

Examinarea culturilor/coloniilor izolate este un proces foarte important, necesită cunoaşterea teoriei, mult exerciţiu, atenţie şi experienţă. Pentru a obţine cele mai bune rezultate este necesară o bună iluminare (preferabil lumina naturală), iar iluminarea mediului care urmează a fi „citit" se va face cel puţin şi în incidenţă oblică. Examinarea se poate face cu ochiul liber (cel puţin iniţial) dar ar trebui completată cu examinarea făcută cu ajutorul unei lupe sau a unui stereomicroscop pentru a putea înregistra toate aspectele importante şi pentru a putea sesiza apariţia coloniilor de dimensiuni mici sau foarte mici.

Aspectul culturilor pe medii lichide

Bacteriile şi fungii facultativ anaerobi se dezvoltă în toată masa de lichid, tulburându-l. Bacteriile strict aerobe se dezvoltă preponderent la suprafaţa mediului.

Se acceptă că de obicei tulpinile care pe mediile solide formează colonii de tip „S" tulbură omogen mediul (majoritatea bacteriilor) în timp ce tulpinile care formează colonii de tip „R" realizează o tulburare mai puţin omogenă. „Variantele R" pot lăsa mediul limpede, formând flocoane care se depun sau un strat (văl) la suprafaţa mediului (de exemplu bacilul difteric sau bacilul tuberculos).

În urma dezvoltării microorganismelor în medii de cultură lichide se mai pot remarca şi pigmentogeneza (ex. *Pseudomonas aeruginosa)* sau utilizând simţul olfactiv se poate constata apariţia unui miros caracteristic (ex. un miros de corn ars în cazul clostridiilor).

Vom prezenta câteva exemple, menţionând că există şi variaţii de la regulă:

- mediul este tulburat omogen (ex. *Staphylococcus spp.);*
- mediul este clar, cu depozit grunjos pe pereţi şi la baza tubului (ex. *S. pyogenes);*
- mediul este clar, cu văl la suprafaţă *(V. cholerae* în apă peptonată alcalină);
- dezvoltarea culturii se realizează ca un „inel" aderent de pereţii tubului, la suprafaţa mediului (ex. *E. coli);*
- mediul este clar cu dezvoltarea unei membrane uscate, la suprafaţă (ex. *Bacillus subtilis);*
- mediul este clar cu apariţia unui depozit floconos aderent la baza tubului *(B. anthracis);*
- mediul este clar, iar la suprafaţă se dezvoltă o membrană groasă, plisată *(M. tuberculosis).*

Aspectul culturilor pe medii solide

Condiţiile de cultivare şi aspectul culturii sunt caractere cheie în identificarea bacteriilor. Aspectul coloniilor variază în funcţie de microorganismul implicat, fără a permite diferenţieri de specie definitive (dar au utilitate în contextul studierii tuturor caracterelor); în anumite cazuri sugerează diagnosticul, dar întotdeauna orientează spre alte testări necesare.

Trebuie să examinăm următoarele elemente:

- **dimensiunea** (coloniile pot fi mari, de peste 2 mm aşa cum se formează în cazul *Staphylococcus spp., K. pneumoniae* etc sau în cazul levurilor; medii, de circa 1-2 mm pentru multe dintre bacteriile studiate; mici, sub 1 mm, spre exemplu în cazul *Streptococcus viridans,* etc şi foarte mici, care se pot examina cu ajutorul stereomicroscopului, aşa cum se întâmplă în cazul *Mycoplasma spp.* sau *Ureaplasma spp.);*
- **marginile** (regulate, neregulate, întregi, circulare, erodate, zimţate, ondulate, lobate, filamentoase, acoperite cu miceliu pufos, invadând mediul în valuri etc);
- **forma** (punctiformă, circulară, neregulată, dendritică, filamentoasă, lenticulară);
- **relieful** (plat, acuminat, convex, bombat, ombilicat, papilat);
- **suprafaţa** (netedă, umedă, lucioasă, mată, uscată, granulară, rugoasă, papilată, zbârcită, mucoidă, pufoasă etc);
- **culoarea** (pigmentate, pigmentarea este la nivelul coloniei sau al mediului, nepigmentate; acest caracter depinde de pigmenţii produşi sau/şi de indicatori de culoare din mediu);
- **opacitatea** (transparente, semitransparente, opace);
- **consistenţa, aderenţa** la mediu (examinate de ex. cu ajutorul ansei bacteriologice);

- **alte caractere,** care vor fi prezentate în continuare.

Tipuri de colonii

Colonia S (smooth) are suprafaţă bombată şi netedă, umedă, margini circulare şi adesea aspect strălucitor. Germenii păstrează structura antigenică şi nu aglutinează spontan cu soluţie salină fiziologică. Germenii capsulaţi îşi păstrează capsula. Virulenţa este conservată. Majoritatea bacteriilor studiate precum şi levurile formează colonii de tip S *(S. aureus, S. pyogenes, E. coli, Candida albicans* etc).

Colonia R (rough) este plată, mată, uscată, suprafaţa ei prezintă rugozităţi, marginile sunt crenelate (zimţate). Structura antigenică nu este caracteristică. Nu păstrează capsula. Virulenţa nu este conservată (excepţii *B. anthracis, M. tuberculosis, C. diphteriae).*

Colonia M (mucoid) este mare, strălucitoare, umedă, mucoasă. Este dată de exemplu de bacteriile care prezintă capsulă (exemplu *Klebsiella pneumoniae).*

Aspecte particulare

- fenomenul de „invazie", reprezintă un caracter de identificare preliminară pentru *Proteus spp.,* o bacterie foarte mobilă; dacă însămânţăm o tulpină care aparţine acestui gen la periferia unei plăci Petri cu mediu simplu (agarizat 2%), de la locul însămânţării cultura se „dezvoltă în valuri concentrice" (se întinde din aproape în aproape) pe toată suprafaţa mediului; pe anumite medii selective, invazia este inhibată şi se pot obţine colonii izolate (adăugăm la mediul de cultură acizi sau săruri biliare, tiosulfat de sodiu etc);
- fenomenul „liniei de demarcaţie", reprezintă un caracter util în studii epidemiologice, în cazul în care tulpinile implicate aparţin genului *Proteus;* dacă pe o placă cu mediu solid cultivăm 2 tulpini diferite, în 2 puncte opuse, tulpinile se vor dezvolta invadând până la un punct în apropierea liniei de întâlnire, unde se va crea o „linie de demarcaţie" între cele 2 tulpini (distanţă de 1-2 milimetri); dacă tulpinile nu sunt diferite va avea loc „creşterea în valuri" fără „demarcaţie" cu dezvoltarea unei „pânze continue" de cultură
- fenomenul de „căţărare", reprezintă o variantă de izolare în cultură pură a unei tulpini de *Proteus;* cultivarea unui produs patologic în lichidul de condens al unui tub cu geloză înclinată incubat în poziţie verticală va conduce (în cazul în care în p. p. există o tulpină de *Proteus spp.)* la obţinerea în 24 ore a unei culturi pure de *Proteus,* care se va dezvolta „în valuri suprapuse" până la partea superioară a mediului de cultură;
- apariţia coloniilor în „cap de meduză"/„coamă de leu", aspect care poate fi caracteristic în cazul izolării unei tulpini de *Bacillus anthracis;* coloniile sunt mari, alb-cenuşii, de tip „R", iar la periferia coloniei, cu ajutorul unei lupe, se pot observa prelungiri ondulate care au dus la denumirile menţionate mai sus;

- apariţia coloniilor pufoase; spre exemplu pe mediul Sabouraud, la 28-30°C, după circa 7 zile, coloniile de *Coccidioides immitis* dezvoltă un miceliu aerian, devin pufoase, cresc şi acoperă în câteva zile suprafaţa mediului; iniţial albe, devin în timp galben-maronii; colonii pufoase pot apărea şi în cursul dezvoltării în anaerobioză a unei tulpini de *Clostridium tetani* etc.

Caractere metabolice

Există numeroase teste care permit investigarea acestor caractere ale microorganismelor. În continuare vom prezenta doar câteva dintre aceste teste (vezi şi capitolul 12 precum şi diferite capitole din partea specială). În capitolul 11 vom mai discuta şi despre câteva dintre testele care evidenţiază caractere de patogenitate ale bacteriilor sau fungilor. Este de remarcat faptul că unele dintre testele care vor fi discutate ar putea fi incluse atât în grupul caracterelor metabolice cât şi în grupul caracterelor de patogenitate (ex. hemoliza în cazul anumitor microorganisme, producerea unor enzime cu caracter de toxine etc).

1. Pigmentogeneza

Pigmentogeneza este caracteristică bacteriilor cromogene şi este dependentă de condiţiile de cultivare. Poate reprezenta un element util pentru identificare (de exemplu pentru *Pseudomonas aeruginosa* sau pentru *Staphylococcus spp.).*

După localizarea pigmentului, bacteriile pot fi cromofore (pigmentul este legat în citoplasmă); paracromofore (pigmentul este prezent în perete sau în stratul mucos, de exemplu pigmentul auriu la *S. aureus,* pigmentul galben-citrin la *S. saprophyticus);* cromopare (pigmentul albastru, galben-verzui, sau de altă culoare este difuzibil în mediu, de exemplu la *Pseudomonas aeruginosa).*

Fungii pot produce o serie de pigmenţi, spre exemplu coloniile de *Candida albicans* au culoare albă. Mucegaiurile produc o varietate mult mai mare de pigmenţi (ex. *Aspergillus deflectus* – colonii cenuşii cu periferia roz sau cu pete galbene, *Aspergillus flavus* – colonii galben verzui până la verde închis, iar privite pe partea cealaltă a plăcii sunt roşii-brune, *Aspergillus fumigatus* – colonii iniţial albe care devin albastre-verzui sau albastre, iar privite pe cealalaltă parte a plăcii sunt colorate brun sau în alte culori, *Aspergillus niger* – colonii iniţial albe care devin brun negre păstrând o culoare albă pe circumferinţă, iar privite pe cealalaltă parte a plăcii sunt colorate în galben etc).

2. Producerea unor hemolizine

Unele microorganisme produc enzime (hemolizine) care lizează hematiile din mediile de cultură cu sânge. Hemoliza are diferite aspecte în funcţie de mecanismul de acţiune şi specia de origine a hematiilor (cal, berbec, iepure etc). Câteva exemple de hemolizine:

1. α-hemolizina produce o liză incompletă a hematiilor, zona având o culoare verzuie (ex. *Streptococcus viridans, Streptococcus pneumoniae);*

2. α-hemolizina produce liza hematiilor în „2 zone", în apropierea coloniei există un halou de hemoliză incompletă înconjurat de o zonă de hemoliză completă (ex. unele tulpini de *Streptococcus spp.);*

3. β-hemolizina produce liza completă a hematiilor, zona de hemoliză este clară (ex. *Streptococcus pyogenes, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Haemophilus ducreyi);*

4. β-hemolizina care produce o hemoliză de tip „cald-rece" (zone de hemoliză incompletă la 37°C care, după menţinerea culturii la +4°C timp de câteva ore, devine completă; ex. anumite tulpini de *Staphylococcus aureus);*

5. γ-hemolizina produsă de *Staphylococcus spp.* lizează de iepure, om, oaie, dar nu produce zone de hemoliză pe agar-sânge; în cazul streptococilor, „γ-hemoliza" indică absenţa hemolizei.

3. Producerea altor enzime

- catalază (ex. *Mycobacterium spp., Staphylococcus spp.);*
- carbohidraze (evidenţiate pe medii diferenţiale, vezi capitolele 12 şi 28-34);
- gelatinază (cultura microbiană lichefiază gelatina, ex. *Clostridium perfringens);*
- lecitinază (ex. *Bacillus anthracis, Clostridium spp.);*
- nitrat-reductază (ex. *Mycobacterium spp.);*
- oxidază (ex. *Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae);*
- termonuclează (ex. *Staphylococcus aureus)* etc.

4. Alte caractere metabolice

- acţiunea reducătoare (evidenţiată de ex. la *C. diphteriae* cultivat pe mediu cu telurit de K);
- sensibilitatea la diferite temperaturi;
- toleranţa la un anumit pH (ex. *V. cholerae* se multiplică la pH alcalin);
- toleranţa la o anumită concentraţie de NaCl (ex. *Staphylococcus aureus);*
- sensibilitatea la optochin (ex. *S. pneumoniae)* sau la bacitracină (ex. *S. pyogenes)* etc.

Caractere de patogenitate

Patogenitatea reprezintă capacitatea unui germen de a declanşa în organismul gazdă fenomene morbide, patogene, modificări locale, generale şi „functio laesa".

Patogenitatea este un atribut de specie şi este determinată genetic. Virulenţa reprezintă gradul diferit de patogenitate exprimat în cadrul unei specii. Este un atribut al tulpinii microbiene implicate.

Caracterele de patogenitate pot fi evidenţiate in vitro sau in vivo.

Teste efectuate in vitro

- examinarea aspectului coloniilor (majoritatea speciilor bacteriene sunt patogene în forma „S", cu excepţia bacililor antraxului, difteric şi tuberculos); are aspect orientativ;
- efectuarea anumitor teste biochimice/metabolice, cu aspect orientativ (examinarea pigmentogenezei, fermentarea manitei, testul coagulazei, testul fibrinolizei, producerea de hemolizite etc); dintre testele menţionate este de luat în consideraţie în primul rând testul coagulazei;
- evidenţierea producerii unor toxine;
  - endotoxine (testul *Limulus;* prezenţa endotoxinei produce gelificarea unui lizat de *Limulus polyphemus);*
  - exotoxine (testul ELEK/vezi capitolul 16, ELISA, efecte citopatice, testul producerii de lecitinază, testul plăcilor semi-neutralizate etc).

Teste efectuate in vivo

În acest scop se utilizează animale de laborator sensibile faţă de infecţia experimentală cu diferite microorganisme sau faţă de anumite toxine microbiene (ex. şoareci albi, cobai, iepuri, pisici etc., în funcţie de specia microbiană pentru care se efectuează testul/specia de animal cea mai sensibilă şi calea de inoculare cea mai potrivită). Animalele de laborator trebuie să fie sănătoase, verificarea se face prin examinarea acestora înainte de efectuarea testării, pe parcursul a 10-14 zile. După inoculare, animalele sunt marcate şi ţinute sub observaţie (ferite de orice contaminare); observaţia este clinică urmărindu-se evoluţia curbei febrile şi apariţia semnelor de boală. Pentru orice test se recomandă utilizarea unui lot de animale pentru acelaşi tip de inoculare, ceea ce creşte suplimentar costul acestui tip de testare. În continuare vom prezenta câteva exemple:

- identificarea *Bacillus anthracis:* pregătim o suspensie a tulpinii care urmează a fi testată în soluţie salină fiziologică şi injectăm subcutanat, câte 0,2 ml pentru fiecare animal, la un lot de şoareci albi; urmărim evoluţia timp de 2-3 zile şi efectuăm frotiuri din sângele recoltat prin puncţionarea cordului sau amprente de splină;
- testarea toxigenezei unei tulpini de *Corynebacterium diphteriae:* obţinem o cultură de 24 ore a tulpinii de identificat; inoculăm subcutanat, în regiunea abdominală câte 2-5 ml de cultură pentru fiecare animal, la 2 loturi de cobai (un lot neprotejat, al doilea lot protejat cu câte 1000 UI de ser antidifteric pen-

tru fiecare animal); în cazul în care tulpina este toxigenă, animalele neprotejate vor muri în 1-4 zile, cu semne de intoxicaţie difterică (congestia capsulelor suprarenale, lichid seros, serofibrinos sau fibrinos în pleură, pericard, peritoneu şi edem gelatinos la locul de inoculare) în timp ce animalele protejate nu prezintă nici o reacţie;

- toxinotipia în cazul suspicionării unei toxi-infecţii alimentare cu *Clostridium botulinum:* se obţine supernatant după centrifugarea unor produse patologice sau alimentelor incriminate şi triturate la care se adaugă antibiotice pentru a inhiba multiplicarea florei de asociaţie; se va utiliza supernatant ca atare şi supernatant după menţinere timp de 15 minute la 100°C (şi răcire) toxina botulinică fiind termolabilă; se vor inocula 4 loturi de şoareci (0,5 ml/şoarece) sau cobai (1 ml/cobai) după cum urmează:
  - supernatant ca atare;
  - supernatant inactivat;
  - 0,1 ml ser antitoxină A urmat la 30 minute de supernatant;
  - 0,1 ml ser antitoxină B urmat la 30 minute de supernatant;
  - spre exemplu, în cazul în care animalele din loturile 1 şi 4 mor, iar animalele din loturile 2 şi 3 supravieţuiesc, în p.p. există toxină botulinică de tip A.
- identificarea infecţiei pulmonare cu *Streptoccus pneumoniae* sau cu *Klebsiella pneumoniae:* realizăm un amestec de spută şi soluţie salină fiziologică sterilă şi inoculăm subcutanat sau intraperitoneal câte 5 ml de p.p. pentru un animal; la un lot de şoareci albi; prezenţa microorganismului va produce în 24-48 de ore o septicemie mortală; facem frotiuri şi culturi din sângele recoltat prin puncţie cardiacă, lichid peritoneal şi amprentă de splină; pentru determinarea tipului capsular putem face reacţia de umflare a capsulei (vezi capitolul 12);
- identificarea etiologiei stafilococice a unei toxi-infecţii alimentare (producerea enterotoxinei): după ce se obţine în cultură tulpina de stafilococ (pornind de la materii fecale, lichid de vărsătură, alimente) se repică în agar 0,5% şi se incubează 48 ore în atmosferă de CO_2; se filtrează mediul iar lichidul obţinut se menţine la temperatura de fierbere timp de 30 minute (enterotoxina este termostabilă); testul Dolman se face la pisoi de 2-3 luni la care se inoculează intraperitoneal 1-3 ml din filtratul răcit; după 20-120 minute, în cazul prezenţei enterotoxinei apare o stare de nelinişte, agitaţie urmate de diaree, vărsături şi somnolenţă; după 1-2 zile animalele inoculate îşi revin;
- cercetarea patogenităţii unei tulpini de stafilococ se face la iepure, care este animalul de laborator cel mai sensibil la infecţia experimentală cu *Staphylococcus aureus;*

- testarea patogenităţii unor levuri (ex. *Candida albicans):* pornind de la o cultură de 24 de ore în mediul Sabouraud lichid separăm sedimentul şi realizăm o suspensie 0,2% a acestuia în soluţie salină fiziologică sterilă; inoculăm în venele cozii la un lot de şoareci (câte 0,2-0,8 ml pentru fiecare animal) suspensia obţinută şi urmărim evoluţia animalelor timp de 4-10 zile; dacă este vorba de o tulpină de *C. albicans* patogenă, animalele vor muri după circa 1 săptămână (anatomopatologic vom putea evidenţia abcese miliare renale, splenice, hepatice) etc.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12. TESTE DE IDENTIFICARE AVÂND LA BAZĂ DIFERITE CARACTERE BIOCHIMICE ALE BACTERIILOR ŞI FUNGILOR

Există numeroase teste utile în identificarea bacteriilor şi fungilor, având la bază diferite proprietăţi biochimice ale acestora; câteva dintre teste vor fi prezentate în continuare.

Aceste teste de identificare au o importanţă diferită la diferitele genuri şi specii bacteriene şi respectiv fungice şi „fac parte" din etapa a patra a diagnosticului de laborator bacteriologic sau micologic. Schema de prezentare este însă asemănătoare.

Există sisteme comerciale manuale şi automate utile pentru identificarea speciilor microbiene. Spre exemplu, sistemul semiautomat de identificare şi testare a sensibilităţii la antibiotice a bacteriilor izolate, **miniAPI,** permite identificarea unei game foarte largi de specii microbiene; necesită utilizarea unui inocul standard realizat pornind de la o cultură bacteriană pură.

12.1. Utilizarea unui carbohidrat ca unică sursă de carbon – Auxanograma

Principiu

Diferitele levuri prezintă un anumit echipament enzimatic cu ajutorul căruia pot, spre exemplu, să utilizeze un anumit carbohidrat ca unică sursă de carbon. Dezvoltarea unei levuri pe un mediu în care este inclus un singur carbohidrat demonstrează utilizarea acestuia ca unică sursă de carbon (asimilarea carbohidratului respectiv). În mod asemănător se poate testa capacitatea asimilării unor substanţe azotate de către levuri.

Materiale necesare

- cultura pură a levurii de identificat, pe pantă de agar Sabouraud;
- mediu pentru asimilarea carbonului de către levuri;
- soluţie de vitamine;
- soluţii 5% ale carbohidraţilor (ex. glucoză, maltoză, zaharoză, lactoză, galactoză, trehaloză etc) în apă distilată, sterilizate prin filtrare;
- rondele din hârtie de filtru, sterile (diametru 6 milimetri).

Tehnica de lucru

Cultura fungică este suspensionată în 5 ml de apă distilată sterilă. Mediul de cultură pentru asimilarea carbonului este încălzit până la topire şi apoi răcit la 50°C.

Într-un tub steril cu capacitatea de 30 ml introducem aseptic 20 ml de mediu, 2 ml soluţie de vitamine şi 0,25 ml din suspensia fungică (levurică) după care amestecul este turnat într-o placă Petri sterilă şi se aşteaptă solidificarea mediului împreună cu celelalte componente.

Depunem aseptic 5 rondele din hârtie de filtru, una în centru şi 4 spre periferia fiecărui cadran al plăcii şi imediat, utilizând o ansă cu diametrul buclei de 3 mm, depunem pe fiecare dintre rondele ceea ce vom preleva din diferite (5) soluţii de carbohidraţi

- obligatoriu vom preleva din soluţia de glucoză;
- dacă dorim să testăm pentru 9 carbohidraţi diferiţi avem nevoie de 2 plăci Petri.

Incubăm la 28-30°C pentru 24-48 ore, apoi urmărim apariţia culturii în jurul rondelelor.

Există şi alte modalităţi tehnice în realizarea auxanogramei.

Interpretare

- trebuie să existe multiplicare levurică (cultură prezentă) în jurul rondelei pe care am depus o ansă din soluţia 5% de glucoză; toate levurile pot folosi glucoza drept unică sursă de C;
- se notează dezvoltarea culturii în jurul rondelelor unde aceasta este evidenţiată şi utilizând rezultatele obţinute, în contextul celorlalte date de laborator, se stabileşte specia levurică.

Control de calitate

- tulpina de referinţă de *Cryptococcus laurentii;*
- tulpina de referinţă de *Candida pseudotropicalis.*

12.2. Testul sensibilităţii la bacitracină

Principiu:

Multiplicarea streptococilor de grup A este inhibată de bacitracină (antibiotic produs de *Bacillus licheniformis).* Se apreciază că dintre tulpinile de *Streptococcus pyogenes,* mai puţin de 1% sunt rezistente la bacitracină.

Materiale necesare

- colonii β-hemolitice izolate pe geloză-sânge;
- microcomprimate de bacitracină cu 0,04 U şi cu 0,1 U (şi nu cu 10 U/microcomprimat).

Tehnica de lucru

Se prelevează 3-4 colonii β-hemolitice şi se însămânţează în striuri foarte apropiate, suprapuse în 3 direcţii, pe o jumătate de placă Petri cu geloză-sânge (din motive de economie se poate utiliza şi un sector de placă).

Plasăm în centrul ariei însămânţate un microcomprimat cu bacitracină şi incubăm pentru 18-24 ore la 35-37°C.

Interpretare

Testul este pozitiv (bacteria este sensibilă la bacitracină) în cazul în care:

- rezultă o inhibiţie a creşterii bacteriene, indiferent de diametru, în jurul microcomprimatului cu 0,04 U bacitracină;
- rezultă o inhibiţie a creşterii bacteriene cu diametrul ≥ 11 mm, în jurul microcomprimatului cu 0,1 U bacitracină.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Streptococcus pyogenes;*
- Martor negativ – *Streptococcus agalactiae.*

12.3. Testul bilolizei (Neufeld)

Principiu

Pneumococii *(Streptococcus pneumoniae)* capsulaţi sunt lizaţi în prezenţa bilei sau sărurilor biliare (unele tulpini necapsulate nu suferă acest proces) prin activarea unei enzime autolitice.

Materiale necesare

- colonii izolate, α-hemolitice;
- soluţie de dezoxicolat de sodiu 10%;
- soluţie salină izotonă;
- apă distilată.

Tehnica de lucru

Se prepară în soluţie salină fiziologică o suspensie pornind de la coloniile hemolitice izolate. Turbiditatea suspensiei trebuie să fie asemănătoare cu turbiditatea etalonului McFarland 0,5 sau 1.

Repartizăm câte 0,5 ml din suspensie în 2 eprubete de sticlă.

În primul tub adăugăm 0,5 ml dezoxicolat de sodiu, iar în al doilea tub adăugăm 0,5 ml apă distilată. Incubăm timp de 2 ore la 35-37°C.

Interpretare

- Testul este pozitiv (bacteriile au fost lizate în prezenţa dezoxicolatului de sodiu şi sunt pneumococi) dacă suspensia s-a clarificat în tubul în care am adăugat dezoxicolat şi nu s-a clarificat în tubul în care am adăugat apă distilată;
- Testul este negativ dacă ambele tuburi au rămas opace.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Streptococcus pneumoniae;*
- Martor negativ – *Streptococcus viridans.*

12.4. Testul CAMP

Principiu

Streptococii de grup B produc o substanţă extracelulară de natură proteică denumită factorul CAMP (după iniţialele cercetătorilor care au pus la punct testul/ Christie, Atkins, Munch-Petersen), care acţionează sinergic cu β-lizina produsă de unele tulpini de *Staphylococcus aureus.* Dacă aceste 2 microorganisme sunt cultivate în 2 striuri perpendiculare (fără să se atingă), acolo unde cele 2 striuri se învecinează, liza hematiilor (de berbec sau de bou) apare mărită, în „formă de vârf de săgeată".

Materiale necesare

- colonii de streptococi hemolitici sau nehemolitici (dacă un anumit context sau anumite teste sugerează prezenţa unui streptococ de grup B);
- plăci Petri cu geloză sânge de berbec sau de bou;
- tulpina de *S. aureus* producătoare de β-lizină (ATCC 25923)/alternativ am putea utiliza fâşii din hârtie de filtru impregnate cu β-lizină stafilococică;
  - ATCC = American Type Culture Collection;
- tulpini de cercetat.

Tehnica de lucru

Inoculăm în striu o tulpină de *S. aureus* producătoare de β-lizină, pe unul din diametrele plăcii cu agar-sânge. Perpendicular pe acest striu vom inocula (fără să atingem striul de stafilococ) o tulpină CAMP pozitivă, o tulpină CAMP negativă şi tulpini de cercetat.

Incubăm la 35-37°C aerob până a doua zi sau timp de 6 ore în atmosferă de 5-10% CO_2.

Interpretare

- apariţia unei zone de hemoliză lărgite, în „vârf de săgeată" (vârful spre tulpina de stafilococ) reprezintă un test pozitiv (confirmat de martorul pozitiv);

• hemoliză nemodificată – test negativ (confirmat de martorul negativ).

Control de calitate

• Martor pozitiv – *Streptococcus agalactiae;*
• Martor negativ – *Streptococcus pyogenes* sau un streptococ de grup D.

12.5. Testul producerii de catalază

Principiu

Catalaza descompune peroxidul de hidrogen în apă şi oxigen.

12.5. A. pentru mycobacterii

Materiale necesare

• cultura pură a microorganismului care urmează a fi testat, pe mediu Löwenstein;
• soluţie de peroxid de hidrogen în Tween 80 şi apă distilată.

Tehnica de lucru

Peste cultura bacteriană se adaugă 1 ml de soluţie de peroxid de hidrogen şi se lasă tubul la temperatura camerei.

Se măsoară înălţimea coloanei de bule de oxigen şi se înregistrează valoarea în mm.

Interpretare

Acesta este un test semi-cantitativ, care ajută la diferenţierea speciilor de mycobacterii în funcţie de cantitatea de catalază produsă. În vederea unei diferenţieri suplimentare, se poate utiliza testul termosensibilităţii catalazei *(Mycobacterium tuberculosis,* spre exemplu, produce o catalază termosensibilă).

Notificarea se poate face în modul următor

• peste 20 mm +++
• 10-20 mm ++
• 5-10 mm +
• 5 mm -

Control de calitate

• Martor pozitiv – *M. fortuitum;*
• Martor mai slab pozitiv (test semicantitativ) – *M. tuberculosis*/în cazul testului pentru termosensibilitatea catalazei rezultatul va fi negativ după încălzire 20 minute la 68°C;

- Martor negativ – mediu neinoculat peste care se adaugă soluţie de peroxid de hidrogen.

12.5.B. pentru alte microorganisme (spre exemplu diferenţierea stafilococilor de alte microorganisme)

Există mai multe tehnici dintre care vom prezenta testul realizat pe o suspensie bacteriană şi respectiv testul catalazei prin suspensionarea culturii pe lamă.

Materiale necesare

- colonii izolate dezvoltate pe medii fără sânge/în cazul în care urmează să testăm o bacterie care s-a dezvoltat pe geloză-sânge, deoarece pot apărea reacţii fals pozitive datorită catalazei eritrocitare, urmează să prelevăm cultura bacteriană fără a atinge mediul de cultură; în acest sens vom utiliza o ansă „fir" şi să prelevăm cultură din porţiunea cea mai bombată a coloniei de identificat);
- soluţie de peroxid de hidrogen 3%;
- apă distilată.

Tehnica de lucru

B1.

Realizăm o suspensie bacteriană densă în 1-2 ml de apă distilată la care adăugăm 1-2 picături de soluţie de peroxid de hidrogen 3%.

Observăm imediat şi după trecerea a 5 minute apariţia bulelor de oxigen.

B2.

Pe o lamă de sticlă punem o picătură din soluţie de peroxid de hidrogen. Suspensionăm cultura în picătura de H_2O_2 şi urmărim timp de 30 de secunde apariţia bulelor de oxigen.

Interpretare

- apariţia bulelor de gaz semnifică un test pozitiv, bacteria produce catalază;
- absenţa bulelor de gaz semnifică un test negativ.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Staphylococcus aureus;*
- Martor negativ – *Streptococcus pyogenes.*

12.6. Testul utilizării citratului ca unică sursă de carbon (Simmons)

Principiu

Unele dintre enterobacterii deţin un echipament enzimatic care permite asimilarea şi utilizarea citratului ca unică sursă de carbon. Utilizând un mediu care con-

ţine citrat şi un indicator de pH, putem indentifica alcalinizarea mediului şi respectiv acea enterobacterie care poate utiliza citratul ca unică sursă de carbon.

Materiale necesare

- o suspensie relativ densă obţinută din colonia (cultură pură) bacteriei pe care dorim să o identificăm;
- mediul care conţine acid citric 0,2% (Simmons), turnat în pantă în eprubete mici; în prezenţa indicatorului de pH şi la pH neutru, mediul neînsămânţat are o culoare verde.

Tehnica de lucru

- cu ajutorul unei anse, prelevăm suspensie bacteriană pe care o însămânţăm într-un singur striu în „zig-zag" pe suprafaţa mediului Simmons;
- incubăm la 37°C şi examinăm dezvoltarea culturii şi eventuala modificare a culorii mediului.

Interpretare

- apariţia unei culturi bacteriene de-a lungul striului, însoţită de modificare culorii care devine albastră, semnifică un test pozitiv = bacteria utilizează citratul ca unică sursă de carbon;
- în prezenţa unui tub fără dezvoltarea culturii, culoarea mediului fiind verde putem notifica un rezultat negativ.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Klebsiella pneumoniae/Enterobacter cloacae;*
- Martor negativ – *Escherichia coli.*

12.7. Testul coagulazei

Principiu

Stafilococii coagulazo pozitivi produc o enzimă care activează coagularea plasmei. Există 2 tipuri de coagulază: coagulaza liberă şi coagulaza legată de peretele celular („clumping factor"). Coagulaza liberă acţionează pe protrombină. Coagulaza legată acţionează direct pe fibrinogenul plasmatic. Stafilococii coagulazo pozitivi sunt consideraţi *Staphylococcus aureus.*

Materiale necesare

- colonii izolate pe mediu neselectiv ale tulpinii care urmează să fie testată

- plasmă de iepure (de preferat)/în cazul în care plasma de iepure nu este disponibilă se poate folosi plasmă umană (cu sensibilitate mai mare la coagulaza produsă de *S. schleiferi* şi *S. lugdunensis);*
- lame, tuburi.

Tehnica de lucru

a. Testul coagulazei pe lamă

Verifică prezenţa coagulazei legate. Pe lamă se depune o picătură de apă distilată (nu soluţie salină fiziologică). Suspensionăm şi omogenizăm 1-2 colonii în picătura de apă distilată (suspensia trebuie să fie tulbure omogen).

Aşteptăm circa 10 secunde şi urmărim apariţia unei eventuale autoaglutinări (caz în care nu putem interpreta rezultatul testului; trecem la efectuarea testului coagulării în tub). Dacă picătura rămâne tulbure omogen, adăugăm 1 picătură de plasmă şi urmărim apariţia „coagulilor" timp de 10-15 secunde.

Alternativ se pot utiliza truse comerciale.

Interpretare

- apariţia „coagulilor" în 10-15 secunde semnifică un test pozitiv;
- absenţa „coagulilor" semnifică un test negativ/5% din *S. aureus* dau reacţii fals negative la testul pe lamă, fiind necesară realizarea testului coagulazei în tub.

b. Testul coagulazei în tuburi

Verifică prezenţa coagulazei libere. Pipetăm aseptic 0,5 ml de plasmă într-un tub steril. Prelevăm o colonie şi o descărcăm în plasma din tub (alternativ putem însămânţa o colonie de testat în 0,5 ml bulion glucozat, incubăm 18-24 ore la 35-37°C şi vom amesteca plasma cu suspensia microbiană rezultată după cultivare).

Incubăm tubul timp de 4 ore la 35-37°C (pentru unele tulpini reacţia poate fi pozitivă chiar şi mai repede de 4 ore). Rezultatul reacţiei este examinat prin înclinarea tubului. Dacă reacţia este negativă la 4 ore, reincubăm până la 24 ore.

Atenţie, cheagul poate fi lizat destul de rapid după momentul formării (unele tulpini de *S. aureus* produc fibrinolizină). Din acest motiv, unii autori recomandă examinare tubului test din 30 în 30 minute, în primele 4 ore.

Interpretare

- formarea unui cheag, semnifică un rezultat pozitiv;
- absenţa cheagului semnifică un rezultat negativ.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *S. aureus;*
- Martor negativ – *S. epidemidis.*

12.8. Testul filamentării, pentru *Candida albicans*

Principiu

După cultivare în ser uman, ser bovin, ser de berbec etc timp de 2-4 ore, la 35-37°C, blastoconidiile individuale de *C. albicans* produc filamente scurte (tubi germinativi).

Materiale necesare

- colonii izolate, în scopul identificării;
- ser uman, ser bovin, ser de berbec, ser fetal de viţel, serumalbumină bovină etc;
- aplicatoare de lemn sau sterile, pipete Pasteur cu vârful efilat, lame şi lamele, tuburi mici.

Tehnica de lucru

Într-un tub de dimensiuni mici (ex. 12/120 mm) introducem aseptic 0,5-1 ml de ser uman sau alt tip de ser. Cu un aplicator steril (ca un beţigaş) atingem colonia care trebuie identificată şi apoi îl introducem în tub. Incubăm timp de 2-4 ore, la 35-37°C.

Realizăm un preparat între lamă şi lamelă şi examinăm la microscopul optic.

Interpretare

- prezenţa unor tubi germinativi cu un calibru mai îngust dar cu o lungime de 3-4 ori mai mare decât diametrul celulei de origine, care continuă direct, fără nici o strangulare sau sept blastoconidia, semnifică un test pozitiv;
- absenţa aspectului menţionat mai sus sau prezenţa unor pseudotubi germinativi care sunt delimitaţi printr-o strangulare şi un sept de blastoconidie semnifică un test negativ.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *C. albicans;*
- Martor negativ – *C. tropicalis.*

12.9. A. Mediul multitest MIU (mobilitate indol uree)

Principiu

Mediul conţine uree, triptofan, roşu fenol (indicator de pH) şi este condiţionat în tuburi de dimensiuni mici. Geloza este moale permiţând mobilitatea microorganismului însămânţat; hidroliza ureei va duce la alcalinizare mediului (culoarea virează de la galben la roşu); producerea de indol din triptofan va fi indicată de înroşirea reactivului Ehrlich.

Materiale necesare

- tuburi de dimensiuni mici cu mediul MIU;
- hârtiuţe indicator cu reactiv Ehrlich (se poate folosi şi reactiv Kovacs) sau reactiv Ehrlich/Kovacs condiţionat în sticluţe de culoare brună;
- colonii de identificat (colonii izolate, cultură pură);
- ansă fir etc.

Tehnica de lucru

Utilizăm pentru însămânţare o ansă fir. Prelevăm din colonia izolată pe mediu neselectiv (dacă pentru cultivare au fost utilizate medii selective trebuie să prelevăm cu grijă, fără să atingem mediul de cultură) şi însămânţăm mediul prin înţepare încercând să realizăm o însămânţare în „linie dreaptă". Fixăm de dop hârtiuţa indicator în aşa fel încât să ajungă deasupra coloanei de mediu, fără să îl atingem. Incubăm la 35-37°C timp de 24 ore. În cazul în care nu are loc virarea culorii mediului, incubăm până la 48 de ore.

Interpretare

- din punctul de vedere al mobilităţii;
  - opacifierea apare numai pe traiectul de însămânţare – bacteria este imobilă;
  - opacifierea este uniformă în coloana de mediu – bacteria este mobilă;
- din punctul de vedere al producerii ureazei;
  - culoarea coloanei rămâne galbenă – bacteria este ureazo negativă;
  - culoarea devine roşie – bacteria este ureazo pozitivă;
  - apariţia unui inel de culoare roşie la suprafaţa mediului nu reprezintă un test pozitiv;
- din punctul de vedere al transformării triptofanului în indol;
  - schimbarea culorii hârtiei la roşu-violet – bacteria este indol pozitivă;
  - culoarea hârtiei rămâne albă – bacteria este indol negativă;
  - alternativ, în lipsa hârtiuţelor indicator se poate picura reactiv Ehrlich la suprafaţa mediului şi interpreta modificarea/lipsa modificării culorii.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Proteus mirabilis* M+ U+ I+;
- Martor negativ – *Shigella spp.* M- U- I-

12.9. B. Mediul multitest MILF (mobilitate indol lizin-decarboxilază fenil-alanin-dezaminază)

Principiu

Mediul conţine o cantitate scăzută de glucoză, peptonă cu DL-triptofan, L-lizină, DL-fenil-alanină, bromcrezol purpur soluţie 2% (indicator de pH) şi este condiţionat în tuburi de dimensiuni mici. Geloza este moale permiţând mobilitatea microorganismului însămânţat. Producerea de indol din triptofan va fi indicată de înroşirea reactivului Ehrlich. Decarboxilarea lizinei va duce la alcalinizare mediului (în absenţa lizin-decarboxilazei rezultă o uşoară acidifiere a mediului datorită fermentării glucozei). Dezaminarea fenil-alaninei duce la apariţia de acid fenil-piruvic şi amoniac; adăugând clorură ferică rezultă o culoare verde.

Materiale necesare

- tuburi de dimensiuni mici cu mediul MILF;
- hârtiuţe indicator cu reactiv Ehrlich (se poate folosi şi reactiv Kovacs) sau reactiv Ehrlich/Kovacs condiţionat în sticluţe de culoare brună;
- colonii de identificat (colonii izolate, cultură pură);
- ansă fir etc.

Tehnica de lucru

Tehnica de lucru este asemănătoare cu cea expusă la punctul 12.9. A.

Interpretare

- din punctul de vedere al mobilităţii
  - opacifierea apare numai pe traiectul de însămânţare – bacteria este imobilă
  - opacifierea este uniformă în coloana de mediu – bacteria este mobilă
- din punctul de vedere al transformării triptofanului în indol
  - schimbarea culorii hârtiei la roşu-violet – bacteria este indol pozitivă
  - culoarea hârtiei rămâne albă – bacteria este indol negativă
- din punctul de vedere al producerii lizin-decarboxilazei
  - alcalinizarea coloanei traduce prezenţa enzimei
  - acidifierea uşoară a coloanei traduce absenţa enzimei
- din punctul de vedere al producerii fenil-alanin-dezaminazei
  - apariţia unui „inel" de culoare verde la suprafaţa mediului şi la nivelul traiectului de însămânţare după adăugarea unei picături de clorură ferică 10% traduce prezenţa enzimei

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Proteus mirabilis* M+ I+ FD-ază+ LD-ază-;
- Martor negativ – *Klebsiella pneumoniae* M- I- FD-ază- LD-ază+.

12.10. Mediul multitest TSI (triple sugar iron)

Principiu

Mediul este agarizat, condiţionat în două „zone" (în coloană la bază şi în pantă) şi conţine glucoză (în raport de 1/10 faţă de celelalte zaharuri), lactoză, zaharoză, citrat feric şi un indicator de pH (roşu neutru). Partea dreaptă (coloana) nu vine în contact cu aerul şi oferă condiţii relative de anaerobioză. Partea înclinată (panta) oferă condiţii de multiplicare în aerobioză.

Concentraţia glucozei este mai mică, pentru ca fermentarea acestui zahar să poată fi detectată chiar dacă este singurul zahar metabolizat. Dacă o bacterie se dezvoltă în partea dreaptă vor fi eliberaţi aminoacizi, care în zona aerobă vor fi decarboxilaţi oxidativ şi vor modifica pH-ul spre alcalin. În cazul în care lactoza şi/sau zaharoza nu sunt fermentate, cantitatea de acid produsă prin fermentarea glucozei (toate enterobacteriile fermentează glucoza) este suficient de mică pentru ca pH-ul de la nivelul pantei să revină rapid la neutru. În acelaşi timp, pH-ul rămâne acid (şi culoarea mediului rămâne galbenă) la nivelul coloanei pentru că în condiţii de relativă anaerobioză nu are loc decarboxilarea oxidativă. Dacă zaharurile de la nivelul pantei sunt fermentate, cantitatea de acid produsă este suficient de mare pentru ca pH-ul de la acest nivel să rămână acid şi respectiv culoarea pantei să rămână galbenă.

Prezenţa citratului feric, în cazul în care bacteria produce H_2S duce la apariţia unei culori negre (se formează sulfit feros).

La nivelul coloanei se mai înregistrează şi producerea de gaz (de la apariţia unor bule fine pe traseul de însămânţare, până la fragmentarea sau „ruperea" coloanei).

Materiale necesare

- tuburi de dimensiuni mici cu mediul TSI;
- colonii de identificat (colonii izolate, cultură pură);
- ansă fir etc.

Tehnica de lucru

Utilizăm pentru însămânţare o ansă fir. Prelevăm din colonia izolată pe mediu neselectiv (dacă pentru cultivare au fost utilizate medii selective trebuie să prelevăm cu grijă, fără să atingem mediul de cultură) şi însămânţăm coloana prin înţepare, apoi retragem ansa şi atingând suprafaţa coloanei descriem un striu în „zig-zag". Incubăm la 35-37°C timp de 24 ore.

Interpretare

- în ceea ce priveşte fermentarea glucozei;
  - culoarea coloanei este galbenă – glucoza este fermentată;
  - culoarea coloanei rămâne roşie – glucoza nu este fermentată (nu este enterobacterie);
  - fermentarea glucozei poate fi sau nu însoţită de producere de gaz;
- interpretarea se face similar pentru fermentarea lactozei/zaharozei, la nivelul pantei;
- în cazul în care se produce H_2S, remarcăm apariţia unei culori negre la nivelul coloanei;
- alte elemente privind interpretarea acestor rezultate vor fi prezentate în capitolul 28.

Control de calitate

- Martor pentru pH acid la nivelul coloanei şi pantei, fără producere de H_2S – *E. coli;*
- Martor pentru pH acid la nivelul coloanei, pH neutru la nivelul pantei şi producere de H_2S – *Salmonella typhimurium;*
- este posibilă şi utilizarea altor tulpini martor.

12.11. Testul producerii de niacină

Principiu

Mycobacteriile produc în timpul multiplicării niacină (acid nicotinic) pe care o utilizează în sinteza NAD şi NADP. Majoritatea mycobacteriilor posedă o enzimă care poate transforma niacina liberă în acid nicotinic mono-nucleotid. Dacă microorganismele nu prezintă această enzimă (ex. *M. tuberculosis),* în mediul de cultură se va acumula niacină. Niacina este solubilă în apă şi poate fi extrasă din mediu (de ex. în soluţie salină fiziologică) iar în reacţie cu bromura de cianogen (**atenţie** la utilizare!) în prezenţa anilinei rezultă un compus de culoare galbenă.

Materiale necesare

- soluţie de anilină 4% (conservată în sticlă de culoare brună la 2-8°C);
- soluţie de bromură de cianogen 10% (ar fi de preferat datorită riscurilor să utilizăm fâşii de hârtie indicator impregnate în soluţie de bromură de cianogen, produse comercial);
- folosim culturi (realizate pe mediul Löwenstein-Jensen), în vârstă de minim 3 săptămâni.

Tehnica de lucru

Folosim o subcultură mycobacteriană cu creştere confluentă. Adăugăm cu ajutorul unei pipete Pasteur apă distilată sterilă sau soluţie salină fiziologică. Cu ajutorul pipetei Pasteur (sau cu ajutorul unei anse) raclăm coloniile pentru a permite extracţia niacinei din mediu. Tuburile rămân 1 oră la temperatura camerei.

Transferăm câte 0,5 ml în fiecare dintre tuburile de testare. Adăugăm succesiv 0,5 ml anilină 4% şi respectiv 0,5 ml bromură de cianogen. Examinăm după 5 minute pentru a observa apariţia culorii galbene în cazul reacţiei pozitive. Înainte de eliminare, vom „neutraliza" tuburile prin adăugarea unui volum egal (aproximativ 3 ml) de NaOH 10 % în fiecare tub.

Interpretare

- apariţia unei culori galbene, reprezintă un test pozitiv;
- absenţa culorii galbene, reprezintă un test negativ.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Mycobacterium tuberculosis;*
- Martor negativ – *Mycobacterium avium.*

12.12. Testul producerii de citocrom oxidază

Principiu

Unele bacterii produc citocrom oxidază, enzimă care lipseşte la bacteriile strict anaerobe. Această hemoproteină acţionează şi asupra unei substanţe, tetra-metil p-fenilendiamină rezultând un compus de culoare purpurie

Dintre bacteriile oxidazo-pozitive amintim *Vibrio spp.,* majoritatea speciilor de *Pseudomonas, Alcaligenes spp, Neisseria spp.* (dintre germenii gram negativi) şi *Micrococcus spp.* (dintre germenii gram pozitivi)

Materiale necesare

- soluţie apoasă de tetra-metil p-fenilendiamină 1% conservată în sticlă de culoare brună la temperatura frigiderului sau fâşii de hârtie indicator impregnată în reactiv (preparate comercial).
- hârtie de filtru;
- ansă cu fir de platină sau pipetă Pasteur (cudată);
- colonii izolate dezvoltate pe agar-sânge, agar-chocolat sau agar Mueller Hinton.

Tehnica de lucru

Există mai multe variante tehnice, dar vom discuta doar una dintre acestea. Punem într-o cutie Petri un fragment de hârtie de filtru pe care depunem 1-2 pică-

turi de soluţie apoasă de tetra-metil p-fenilendiamină 1%. După sterilizarea şi răcirea ansei, prelevăm dintr-o colonie izolată şi descărcăm cultura pe hârtia de filtru prin mişcări circulare de mică amplitudine.

Urmărim apariţia unei reacţii de culoare în interval de 10 secunde

Interpretare

- apariţia unei zone de culoare purpurie în 10 secunde, reprezintă un test pozitiv;
- absenţa culorii purpurie, semnifică un test negativ;
- apariţia zonei colorate mai tardiv nu permite interpretarea testului, în principiu este vorba despre un rezultat negativ.

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Pseudomonas aeruginosa;*
- Martor negativ – *Escherichia coli.*

12.13. Testul sensibilităţii la optochin

Principiu

Majoritatea tulpinilor de pneumococi *(Streptococcus pneumoniae)* sunt sensibile la concentraţii scăzute (< 5 µg/ml) de optochin (hidroclorid de etil-hidrocupreină). Unele tulpini ale altor streptoci care produc hemoliză viridans pot fi sensibile, dar la concentraţii mai mari ale substanţei active, în timp ce alte tulpini sunt rezistente.

Materiale necesare

- discuri cu optochin (5 µg/disc), cu diametrul de 6 milimetri;
- plăci cu agar-sânge;
- tampoane sterile;
- colonii α-hemolitice izolate, care urmează a fi testate.

Tehnica de lucru

Prelevăm cu un tampon steril de preferat 2-3 colonii şi realizăm o însămânţare pe jumătatea unei plăci cu agar-sânge, în aşa fel încât să rezulte o cultură confluentă (din motive de economie, însămânţarea s-ar putea realiza şi pe o pătrime de placă Petri). Plasăm un disc cu optochin în centrul zonei însămânţate şi presăm uşor pentru ca discul să adere uniform. Incubăm timp de 18-24 ore la 35-37°C în atmosferă de 5% CO_2.

Interpretare

- apariţia unei zone de inhibiţie cu diametrul mai mare de 14 mm, semnifică un test pozitiv;

- absenţa inhibiţiei în jurul discului semnifică un test negativ;
- interpretarea este diferită dacă se folosesc discuri de optochin cu alte dimensiuni (ex. cu diametrul de 10 mm).

Control de calitate

- Martor pozitiv – *Streptococcus pneumoniae;*
- Martor negativ – *Streptococcus viridans.*

Fără îndoială că aceste teste reprezintă doar câteva exemple din multitudinea testelor utilizate în laboratorul de microbiologie. Numai în vederea identificării diferitelor specii mycobacteriene se pot utiliza, spre exemplu, peste 130 de teste fenotipice.

Înţelegerea lor din punct de vedere teoretic precum şi utilizarea lor în mod practic sunt utile atât pentru studenţi, medicii rezidenţi aflaţi la debutul pregătirii în specialitatea de medicină de laborator, pentru viitorii medici din alte specialităţi cât şi pentru medicii şi biologii implicaţi în diagnosticul de laborator la nivel clinic sau în interesul sănătăţii publice.

Având la bază noţiunile teoretice învăţate, diferitele exemple precum şi manualele care prezintă din punct de vedere practic diagnosticul microbiologic, fiecare dintre cei implicaţi va putea să aplice aceste elemente, deprinzând arta acestui diagnostic atât de util în practica medicală la nivel individual sau populaţional.

Ultimul test pe care îl vom prezenta în finalul acestui capitol nu se bazează pe proprietăţile biochimice ci are la bază caracterele antigenice (structura antigenică) ale microorganismelor din specia *Streptococcus pneumoniae.*

Datorită faptului că nu există un capitol special al tehnicilor imunologice unde ar putea fi integrat, precum şi datorită faptului că în paginile precedente am prezentat testul bilolizei şi respectiv testul sensibilităţii la optochin (ambele teste fiind necesare în diferenţierea *Streptococcus pneumoniae* de *Streptococcus viridans)* am decis să includem aici, acest test.

12.14. Testul umflării capsulei (Neufeld, Quellung test)

Principiu

Complexul antigen-anticorp format în urma cuplării antigenului capsular pneumococic cu anticorpii anti-capsulari are o refringenţă superioară mediului înconjurător şi apare, la examinarea cu microscopul optic, ca un halou clar dispus în jurul bacteriilor, halou care are dimensiuni mai mari decât haloul identificat prin microscopie (preparat colorat cu albastru de metilen) în lipsa serului anti-capsular.

Materiale necesare

- cultura unei bacterii care se presupune că aparţine speciei *S. pneumoniae;*

- se pot utiliza şi produse patologice (ex. LCR);
- ser anti-capsular polivalent; seruri anti-capsulare monovalente (de tip);
- soluţie de albastru de metilen (1%);
- soluţie salină fiziologică;
- lame şi lamele;
- microscop optic.

Tehnica de lucru

A. examinarea preparatului martor

- realizăm o suspensie omogen opalescentă din cultura bacteriană în 0,5 ml soluţie salină fiziologică şi adaugăm 0,5 ml soluţie de albastru de metilen;
- depunem o picătură din suspensie pe o lamă de microscop, acoperim cu o lamelă şi examinăm dimensiunea haloului care apare datorită prezenţei capsulei.

B. examinarea preparatului test

- depunem pe o altă lamă de microscop o picătură din suspensia bacteriană şi în stricta vecinătate a acesteia depunem o picătură din serul polivalent anti-capsular;
- amestecăm prin mişcări circulare cele 2 picături;
- aşteptăm 10 minute (preparatul se menţine în „cameră umedă").

Interpretare

- identificarea unor coci coloraţi în albastru, dispuşi izolat sau în pereche, înconjuraţi de un halou clar, mai bine definit şi de dimensiuni mai mari decât haloul vizualizat prin examinarea preparatului martor semnifică un test pozitiv, respectiv prezenţa pneumococilor;
- în cazul în care nu este sesizată nici o diferenţă între preparatul test şi preparatul martor ne aflăm în situaţia unui test negativ;
- după identificarea unui test pozitiv faţă de serul polivalent, putem utiliza seruri monovalente, specifice de tip pentru a indentifica tipul capsular;
- testul umflării capsulei se poate realiza şi pornind pe produs patologic.

Control de calitate

- Martor pozitiv – tulpină capsulată de *Streptococcus pneumoniae;*
- Martor negativ – *Streptococcus viridans.*

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

13. TESTE DE IDENTIFICARE RAPIDE/MODERNE

Noţiunile care urmează nu au importanţă din punctul de vedere al unui examen. Opinia noastră este că un viitor medic, indiferent de specialitate, ar trebui să fie informat, să ştie că există şi aceste tehnici de identificare/diagnostic. În funcţie de opţiunile personale, fiecare dintre cei interesaţi se poate documenta suplimentar, fie la curs sau în cadrul lucrărilor practice, fie citind impresionanta documentaţie care a apărut în acest domeniu în ultimii ani. Subliniem din nou faptul că cititorul trebuie să fie conştient că în cele ce urmează sunt prezentate doar câteva exemple, care ar putea fi considerate drept o „sensibilizare" faţă de vastul domeniu al tehnicilor moderne care sunt la îndemână, după caz, în momentul de faţă.

Aceste tehnici au fost puse la punct din diferite motive (creşterea sensibilităţii şi/sau specificităţii, obţinerea unui rezultat mai rapid, imposibilitate cultivării anumitor microorganisme etc); metodele de testare/identificare/diagnosticare moderne vin să completeze metodele clasice care rămân şi astăzi foarte utile. De cele mai multe ori tehnicile de identificare moderne sunt practicate numai la nivelul centrelor de referinţă.

Subliniem faptul că nimic nu trebuie absolutizat, iar diagnosticul în medicină trebuie să ţină cont de datele epidemiologice, clinice, paraclinice, de laborator, la un pacient anume (întotdeauna diagnosticul se va pune într-un caz concret, **la un anume pacient** cu o boală transmisibilă, fiecare pacient poate reacţiona într-un mod particular, interacţiunea dintre gazdă şi microorganismul parazit poate varia în de la caz la caz). În acelaşi sens putem discuta şi despre „raportul" dintre testele „microbiologiei clasice" şi testele „microbiologiei moderne" care se completează reciproc.

Tehnici de biologie moleculară

Din multitudinea tehnicilor existente, vom discuta numai utilizarea sondelor nucleotidice şi tehnica de amplificare genetică.

I. Utilizarea sondelor nucleotidice

Principiu

Hibridizarea acizilor nucleici (AN) reprezintă unirea a 2 fragmente de AN monocatenare, în structuri bicatenare stabile, în condiţii potrivite de temperatură, pH şi concentraţie ionică. Hibridizarea este condiţionată de complementaritatea secvenţelor bazelor celor două catene. În momentul actual se utilizează din ce în ce mai frecvent

sondele nucleotidice marcate ne-radioactiv, reactivii necesari fiind produşi şi livraţi comercial. Vom prezenta în continuare, drept un exemplu, modul de lucru în cazul unei truse comerciale. Acesta are la bază hibridizarea ADN-ARN 16s şi este utilizată în identificarea tulpinilor mycobacteriene aparţinând speciilor din complexul *M. tuberculosis*, din complexul *M. avium* precum şi speciilor *M. kansasii, M. avium, M. intracellulare* şi *M. gordonae;* există şi alte variante tehnice, în funcţie de producător.

Reactivii utilizaţi au în componenţă un ester de acridinium, ceea ce va permite evidenţierea reacţiei pozitive cu ajutorul unui luminometru.

Materiale necesare

- reactivul 1, reactivul 2, reactivul 3 şi reactivul „sondă";
- baie de apă cu ultrasunete;
- aparat termostat 50-100°C;
- luminometru „Leader";
- pipetă mecanică 100-1000 µl;
- vortex (omogenizator);
- tuburi cu medii de cultură solide pe care au fost cultivate mycobacteriile de identificat;
- tuburi cu substrat pentru liza celulelor mycobacteriene.

Tehnica de lucru

Putem începe identificarea tulpinilor mycobacteriene după apariţia coloniilor pe mediile de cultură. După ce pipetăm primii 2 reactivi în tuburile de liză, transferăm în tuburi câte o ansă de cultură şi agităm pentru omogenizare („vortexăm"). Punem tuburile în baie de apă cu ultrasunete (15 minute), în scopul lizării bacteriene şi extragerii ADN-ului cromozomial. Încălzim 10 minute la 95°C pentru inactivarea mycobacteriilor.

Transferăm 100 µl de lizat în tubul în care am pus reactivul „sondă" şi incubăm 15 minute la 60°C, după care adăugăm reactivul 3 şi vortexăm. Incubăm la 60°C pentru o durată care variază în funcţie de apartenenţa ipotetică a tulpinii de testat şi anume: 10 minute pentru complexul *M. tuberculosis*, 8 minute pentru *M. kansasii* şi respectiv 5 minute complexul *M. avium, M. gordonae, M. avium* şi *M. intracellulare*. Lăsăm tuburile să se răcească la temperatura camerei după care le introducem pe rnd pentru citire într-un luminometru.

Interpretare

- în cazul complementarităţii dintre ADN-ul extras din tulpina testată şi sonda nucleotidică, va avea loc hibridizarea şi respectiv va fi evidenţiată emisia luminoasă, reacţia este pozitivă;
- lipsa emisiei luminoase semnifică o reacţie negativă.

Control de calitate

În funcţie de specia mycobacteriană suspectată (pe baza altor criterii clinice, paraclinice, de laborator) vom utiliza:

- Martor pozitiv – *M. tuberculosis* sau *M. avium* sau *M. kansasii* etc;
- Martor negativ – un tub în care nu se introduc celule bacteriene.

II. Tehnica de Amplificarea genetică - Polymerase Chain Reaction (PCR)

Principiu

Tehnica PCR pentru secvenţe specifice de ADN (direct în produsele clinice sau după izolarea microbiană în culturi) constituie o metodă rapidă de detectare a diferiţilor agenţi infecţioşi. Această tehnică presupune utilizarea unor amorse oligonucleotidice specifice ADN-ului ţintă. În urma denaturării termice a catenelor de ADN, amorsele vor hibridiza cu secvenţe complementare de pe acestea. Anumite condiţii de temperatură precum şi prezenţa unei polimeraze termostabile (Taq polimeraza) vor permite copierea ADN-ului ţintă într-o catenă complementară situată în prelungirea amorselor hibridate.

Repetarea procedeului, în condiţii diferite de temperatură necesare denaturării, hibridizării şi polimerizării pe matriţa ADN-ului ţintă (utilizând un sistem automat, într-un aparat construit în acest scop care se numeşte termociclor), conduce la acumularea mai multor milioane de copii ale fragmentului de ADN definit de amorse.

Prin metoda PCR se poate reduce timpul necesar diagnosticului infecţiei cu *M. tuberculosis* de la 3-8 săptămâni (cât durează cultivarea pe mediu solid) la 2-3 zile. Metoda poate fi utilă şi în identificarea tulpinilor de *M. tuberculosis* sau de mycobacterii ne-tuberculoase („atipice").

Materiale necesare

- termociclor
- microcentrifugă şi centrifugă dotată cu sistem de răcire;
- vortex (omogenizator);
- aparat de electroforeză;
- transiluminator UV;
- sistem foto Polaroid;
- pipete automate P2, P20, P200, P1000; vârfuri; tuburi Eppendorf;
- gheaţă şi cutii pentru gheaţă;
- amestec dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
- *Taq* ADN polimeraza şi tampon de amplificare;
- primeri (amorse) pentru *M. tuberculosis* sau pentru *M. avium;*

- **ADN** de amplificat;
- **ADN** ***M. tuberculosis***+ sau ***M. avium***+;
- marker de greutate moleculară **(DNA ladder 1 kb);**
- apă bidistilată sterilă, ulei mineral, fenol saturat cu Tris-EDTA, amestec de cloroform-alcool izoamilic, etanol 70%, soluţie «bleu»;
- agaroză;
- bromură de etidium;
- tampon pentru electroforeză.

Tehnica de lucru

Din punct de vedere practic, testul PCR pentru diagnosticul infecţiilor mycobacteriene comportă 4 etape majore:

1. Tratarea produselor clinice (spută, aspirat bronic, lichid pleural etc) sau a culturii, în vederea lizei celulelor şi eliberării ADN-ului mycobacterian;

2. Amplificarea propriu-zisă în cursul căreia ADN-ul este supus unei succesiuni de cicluri de temperatură, în prezenţa amorselor (primeri) specifice, a nucleotidelor şi a enzimei termostabile Taq polimeraza. Această etapă se realizează în termociclor;

3. Detecţia fragmentului amplificat prin migrarea produsului de amplificare genetică în gel de agaroză 2%, în prezenţa bromurii de etidium şi vizualizare după utilizarea radiaţiilor U.V. (rezultatul se poate fotografia);

4. Confirmarea specificităţii reacţiei PCR prin transferul fragmentelor amplificate din gelul de agaroză pe o membrană de celuloză sau nylon şi hibridizarea cu o sondă specifică, marcată neradioactiv.

1. Extracţia ADN-ului mycobacterian comportă următoarele etape:

1. realizăm tratamentul termic, pentru liza peretelui mycobacterian şi vortexăm;

2. prelevăm 500-600 µl din produs şi transferăm într-un tub Eppendorf de 1,5-2 ml; adăugăm un volum echivalent de fenol saturat cu Tris-EDTA;

3. centrifugăm 15 minute la 12000 ×g;

4. prelevăm cu grijă faza apoasă (superioară) şi o transferăm într-un alt tub Eppendorf; eventual repetăm extracţia cu fenol (până când nu mai apare un precipitat alb proteic la interfaţă);

5. prelevăm ultima fază apoasă şi o transferăm într-un alt tub Eppendorf; adăugăm un volum echivalent de cloroform-alcool izoamilic (24:1);

6. centrifugăm 15 minute la 12000 ×g;

7. prelevăm faza apoasă rezultnd un volum notat cu „X"; adăugăm acetat de amoniu 10 M, pH 5 (în aşa fel încât să rezulte în final o concentraţie de 0,3 M) şi 2,5 volume (raportat la volumul X) de etanol absolut;

8. introducem tubul (tuburile) de lucru pentru 10-30 de minute la -70°C; în acest interval reglăm centrifuga la 0°C;

9. centrifugăm (la rece) 30 de minute la 12000×g;

10. aspirăm lichidul cu precauţie, pentru a nu antrena şi sedimentul (precipitatul); din acest moment tubul de lucru trebuie menţinut în permanenţă rece (utilizăm în acest scop o cutie cu gheaţă);

11. spălăm cu etanol 70% 600-1000 µl, **fără să agităm** tubul şi efectuăm eventual o scurtă centrifugare

12. aspirăm etanolul (cu precauţie, pentru a nu antrena şi precipitatul) şi uscăm precipitatul, fie sub protecţia hotei biologice (cteva ore) fie cu ajutorul unui aparat speed-vac (20-30 minute); între timp putem prepara amestecului de reactivi necesari pentru amplificarea genetică [tampon pentru Taq polimerază 10 X, nNTP 10mM, primul primer (ex. MT_1), al doilea primer (ex. MT_2), apă distilată, Taq polimerază la care se va adăuga ADN-ul „extras"]

13. suspendăm ADN-ul extras în 50 µl apă distilată şi îl congelăm (-20°C) până în momentul utilizării;

14. preparăm amestecul de reactivi (se lucrează „în gheaţă"); Taq polimeraza va fi scoasă ultima din congelator, doar înainte de includerea ei în amestec;

15. în vederea adăugării ADN-ului „extras", în fiecare tub cu reactivi vom introduce câte 2 picături de ulei mineral; ulterior, trecând cu precauţie **prin** uleiul mineral vom include în tuburi şi ADN-ul.

2. Amplificarea propriu-zisă

Tuburile cu reactivi şi ADN-ul purificat, vor fi introduse în termociclor şi sunt supuse unui ciclu de denaturare iniţială (94°C, 5 min) urmat de un număr de 35 de cicluri de amplificare, fiecare ciclu constând din: denaturare la 94°C (2 minute), hibridizare la 50°C (2 minute), extensie la 72°C (2 minute). La sfârşitul celor 35 de cicluri de amplificare urmează o etapă de extensie la 72°C, 10 min.

3. Detectarea fragmentelor amplificate prin reacţia PCR

1. turnăm un gel de agaroză 1% în care după răcirea la 50°C, adăugăm 20 µl bromură de etidium; turnăm gelul (folosim un „piepten" cu 15 dinţi);

2. pregătim probele pentru migrare, amestecând într-un tub Eppendorf 5 µl din produsul de amplificare cu 3 µl soluţie «bleu»; centrifugăm scurt şi depunem în godeurile gelului; într-un godeu al gelului depunem markerul de greutate moleculară;

3. supunem migrării la tensiune constantă de 80V în TBE 1x până când colorantul se deplasează circa 2,5 cm;

4. examinăm şi fotografiem în UV.

4. Confirmarea specificităţii reacţiei PCR

Specificitatea reacţiei s-ar putea controla prin hibridizare cu un oligonucleotid marcat, a cărui secvenţă este derivată din secvenţa studiată (ex. *IS6110).*

Interpretare

- o reacţie pozitivă pentru *M. tuberculosis (IS6110)* este reprezentată de un amplicon (produs de amplificare genetică) având o dimensiune de 201 pb în timp ce pentru *M. tuberculosis (Mt308)* este reprezentată de un amplicon având o dimensiune de 276 pb
- o reacţie pozitivă pentru *M. avium* este reprezentată de un amplicon având o dimensiune de 205 pb;
- din cauza sensibilităţi foarte crescute a reacţiei de polimerizare în lanţ (amplificarea unei singure molecule ADN) trebuie luate o serie de măsuri care să prevină contaminarea cu acizi nucleici exogeni, spre exemplu
  - nu se prepară ADN, reactivi şi amestecurile pentru reacţie în spaţiile în care se manipulează produşii PCR; se recomandă ca diferitele etape să fie executate în camere separate; în plus, este recomandată folosirea hotelor cu flux laminar dotate cu surse de lumină UV pentru inactivarea ADN contaminant;
  - manipularea produşilor PCR se face cu un set separat de pipete utilizând vârfurilor cu con prevăzute cu filtru care micşorează contaminarea prin aerosoli;
  - se lucrează numai cu mănuşi care se schimbă frecvent;
  - reactivii se păstrează în eşantioane mici (de regulă pentru o singură folosire), de preferat într-un spaţiu de congelare special destinat acestui scop;
  - întotdeauna se include un tub-martor negativ, care conţine toate componentele reacţiei de amplificare cu excepţia ADN; acesta se pregăteşte ultimul etc.

Control de calitate

- Martor pozitiv - ADN extras din tulpina de referinţă pentru *M. tuberculosis,* H_{37} R_V;
- Martor negativ – tub cu toţi reactivii în afară de ADN.

Tehnici cromatografice

Cromatografia a început să fie utilizată încă din 1905, însă metoda a fost mult îmbunătăţită în timp. Cromatografia reprezintă o tehnică de separare şi/sau identificare a unor structuri chimice aflate în amestec, dacă acestea au solubilităţi diferite în două faze, una mobilă şi alta staţionară. Prin realizarea acestei tehnici rezultă o cromatogramă cu ajutorul căreia se pot face analize calitative sau cantitative. Tehnicile cromatografice se pot utiliza în microbiologie în următoarele scopuri:

1. Diagnosticul rapid al infecţiilor, pornind de la produse patologice sau cultură

Prin tehnici cromatografice se pot identifica anumiţi compuşi care sunt în mod caracteristic asociaţi cu agentul etiologic al unei anumite boli transmisibile, spre exemplu:

- identificarea şi analiza unui amestec de acizi graşi cu lanţ scurt (volatili şi nevolatili) în puroi, lichid pleural, lichid de ascită etc, semnificând o infecţie cu bacterii anaerobe (GC-FID);
- determinarea prezenţei manozei şi D-arabinolului la pacienţi cu candidoză sistemică (GC-FID);
- determinarea prezenţei acidului -hidroximiristic, pentru a demonstra existenţa unei infecţii cu bacterii gram negatice (GC, MS, MS-SIM);
- identificarea acidului tuberculostearic în spută sau LCR şi/sau acizilor micocerozici în cultură de 5 zile, pentru diagnosticarea infecţiilor produse de mycobacterii; metoda ar fi extrem de utilă în meningita tuberculoasă, o adevărată problemă de diagnostic (TLC, GC);
- determinarea unor concentraţii crescute de acid lactic în LCR, lichid de ascită, lichid pleural etc pentru a diferenţia inflamaţia bacteriană de cea ne-bacteriană (GC) etc.

2. Identificarea rapidă a unor microorganisme

- determinarea prezenţei acizilor graşi cu lanţ lung (ex. acizi micolici), caracteristici pentru *Mycobacterium spp., Nocardia spp.* etc (TLC, GC, MS);
- analiza acizilor micolici care permite identificarea a peste 40 de specii din genul *Mycobacterium* (HPLC);
- analiza produşilor de metabolism (acizi organici cu lanţ scurt, alcooli) pentru identificarea bacteriilor strict anaerobe; fiecare acid pus în evidenţă într-o anumită cultură este identificat prin comparare cu datele dintr-o cromatogramă standard (GLC) etc.

Câteva elemente tehnice

Toate metodele cromatografice necesită existenţa unei faze mobile şi unei faze staţionare. Faza mobilă poate fi un gaz sau un lichid. Faza staţionară poate fi un lichid sau un solid. Diferitele componente ale unui amestec se absorb în mod diferenţiat la o suprafaţă sau se dizolvă în mod diferenţiat în cele două faze imiscibile. Pentru că fiecare compus are o anumită solubilitate specifică în raport cu cele două faze, extracţia compuşilor din amestec dintr-o fază sau alta se va face cu eficienţe diferite.

În funcţie de fenomenul „utilizat" (absorţie, adsorbţie, partiţie, schimb de ioni etc) există diferite tehnici cromatografice. Aşa cum am enumerat mai sus (între paranteze) tehnica cromatografică se alege şi în funcţie de substanţa care urmează

a fi analizată. Modul de detectare pentru diferitele molecule este şi el diferenţiat în funcţie de semnalul biologic (determinare spectrofotometrică a absorbanţei luminii în funcţie de concentraţia substanţei, detectarea pH-ului, detectarea unor substanţe care se colorează prin diferite tehnici etc).

GC = gaz cromatografie; FID = detector cu ionizare în flacără (flame ionization detector); MS = spectrometrie de masă (mass spectrometry); SIM = monitorizare selectată a ionilor (selected ion monitoring); TLC = cromatografie în strat subţire (thin layer chromatography); HPLC = lichid cromatografie de înaltă performanţă (high performance liquid chromatography); GLC = gaz lichid cromatografie

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14. TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE ȘI CHIMIOTERAPICE

Testarea sensibilităţii la medicamentele antimicrobiene se realizează (din punct de vedere didactic) în a cincea etapă a diagnosticului de laborator microbiologic, pentru majoritatea microorganismelor implicate etiologic. Testarea este necesară datorită apariţiei şi extinderii rezistenţei multor microorganisme la antibiotice şi chimioterapice (rezistenţa = capacitatea de a supravieţui şi de a se multiplica în prezenţa medicamentului antimicrobian). Rezistenţa poate fi naturală sau dobândită. Rezistenţa naturală este determinată genetic. Rezistenţa dobândită este „achiziţionată" de anumite subpopulaţii dintr-o anumită specie microbiană, în circumstanţe date; de exemplu antibioticul acţionează ca un presor selectiv.

Antibioticele şi **chimioterapicele** antimicrobiene reprezintă un grup de substanţe medicamentoase capabile să distrugă sau să blocheze multiplicarea microorganismelor (în continuare vom utiliza numele de **„antibiotice"** pentru ambele tipuri de produse medicamentoase). Au o acţiune selectivă asupra celulelor microorganismelor, exercitând acţiuni minime asupra celulelor organismului gazdă. În continuare vom discuta numai despre medicamentele antibacteriene şi antifungice.

Alegerea corectă a antibioticelor în tratamentul bolilor infecțioase

Modificări ale spectrului antimicrobian iniţial

Implicaţiile clinice, terapeutice, epidemiologice şi administrative ale fenomenului de rezistenţă bacteriană la antibiotice şi chimioterapice sunt extrem de mari. Selectarea tulpinilor rezistente (adeseori datorită unor abuzuri de prescriere, în spitale, alte unităţi sanitare sau prin auto-medicaţie), duce la variate aspecte negative: infecţii cu germeni rezistenţi, apariţia şi transmiterea „germenilor de spital", devalorizarea şi pierderea unor medicamente antimicrobiene etc. Este strict necesară supravegherea fenomenului de rezistenţă la antibiotice şi chimioterapice, testarea sensibilităţii germenilor, notificarea şi evaluarea statistică, publicarea periodică a datelor şi punerea lor la dispoziţia sistemului sanitar.

Etape de urmat în vederea instituirii corecte a unui tratament cu antibiotice

1. Se ia decizia de a recurge la antibioterapie; în acest scop trebuie să ne punem cel puţin următoarele 2 întrebări: a. este în discuţie o infecţie certă sau foarte probabilă? b. care este „terenul" pe care s-a instalat infecţia (este o gazdă normo-competentă imunologic)?

2. Se aleg antibioticele care urmează a fi prescrise; în acest scop trebuie să avem în vedere: a. stabilirea diagnosticului etiologic, b. testarea sensibilităţii la antibiotice, c. proprietăţile farmacologice ale antibioticelor propuse pentru a fi folosite, d. criteriul economic, e.posibilitatea şi oportunitatea utilizării unor asocieri de antibiotice etc.

3. Precizarea căii şi modului de administrare pentru antibioticul ales.

Controlul terapiei antimicrobiene se va realiza pe tot parcursul administrării şi va cuprinde metode clinice (ex. ameliorarea simptomatologiei) şi de laborator (examene paraclinice, dozarea antibioticelor în ser etc).

Erori frecvente în utilizarea antibioticelor

Antibiotico-terapia se află într-un impas constatat clinic prin numeroase eşecuri terapeutice şi confirmat prin studii de laborator. Principalele probleme sunt reprezentate de un număr imens de prescrieri abuzive şi de folosirea iraţională a unor antibiotice. Ca rezultat se constată apariţia de specii sau de tulpini („mutante") bacteriene cu rezistenţă la antibiotice şi înmulţirea reacţiilor adverse faţă de aceste medicamente.

Soluţia cea mai bună pentru prevenirea acestor probleme este folosirea raţională a medicamentelor antimicrobiene deja existente, în acest sens fiind necesar să cunoaştem care sunt cele mai frecvente erori în folosirea antibioticelor.

1. Este incorectă utilizarea antibioticelor în lipsa unui diagnostic clinic, folosirea acestor medicamente în orice „stare febrilă" (temperatura trebuie monitorizată corespunzător), în „bănuiala unei infecţii", în cursul unui tratament „la întâmplare" sau „pe încercate", nefundamentat pe criterii raţionale (cel puţin criterii de probabilitate). Oferirea criteriilor de probabilitate este o datorie a centrelor naţionale de referinţă care trebuie să realizeze şi să publice periodic studii privind circulaţia tulpinilor microbiene, implicarea acestora în diferitele entităţi clinice, sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor izolate etc.

2. Este incorectă prescrierea unui medicament antimicrobian în afara contextului (şi interpretarea corectă a datelor de laborator). Indiferent de specialitate este necesară cunoaşterea şi utilizarea în mod corespunzător a unor noţiuni elementare de microbiologie. Nu se va începe antibioticoterapia înainte de recoltarea produsului patologic şi de efectuarea unor examene paraclinice elementare (leucogramă, VSH, radiografie, sumar de urină etc). Nu trebuie să uităm că în supiciunea unei infecţii avem la îndemână posibilitatea efectuării de preparate între lamă şi lamelă şi frotiuri colorate, a căror examinare poate dura uneori doar 5 minute, permiţând în scurt timp obţinerea unui rezultat orientativ, uneori foarte important. Încă din al doilea an de studiu se obţin primele date referitoare la testarea sensibilităţii la antibiotice (antibiograma), metodă care nu trebuie interpretată mecanic, nu trebuie nici subestimată şi nici supraevaluată.

3. Este incorect să nu cunoaştem şi să nu utilizăm corespunzător noţiunile şi datele privind spectrul antimicrobian, folosirea antibioticului de elecţie, difuzibilitatea în focar, mecanismul de acţiune, reacţiile adverse posibile.

4. Utilizarea antibioticelor în scop profilactic trebuie privită cu rezerve. Este incorect să nu cunoaştem foarte bine situaţiile în care antibioticoprofilaxia este utilă şi recomandabilă.

5. Este incorect să nu acumulăm cunoştinţele necesare de microbiologie, farmacologie, fiziopatologie, semiologie medicală, medicină internă, care contribuie la evitarea erorilor în conducerea tratamentului sau/şi greşelile în tehnica de administrare.

6. Este incorect ca atunci când avem un dubiu cu privire la decizia pe care urmează să o luăm să nu ne consultăm cu alţi colegi, pentru a alege întotdeauna cea mai bună variantă posibilă.

Testarea sensibilității la agenți antimicrobieni

În general, o tulpină poate fi considerată sensibilă atunci când germenii sunt în mod eficient afectați de către antibiotic, iar efectul terapeutic poate fi obținut cu doze și pe căi de administrare „obișnuite". Tulpina va fi considerată moderat sensibilă dacă germenii sunt afectați într-o măsură mai mică, iar efectul terapeutic nu poate fi obținut decât în condiții speciale (ex. prescrierea unor doze mai mari decât cele „obișnuite", utilizarea unor căi de administrare speciale/injectare intravenoasă, intrarahidiană etc). În mod absolut se consideră că o tulpină este rezistentă dacă rezultatul testării sensibilității in vitro este negativ.

Metode de testare a sensibilității bacteriilor la agenți antimicrobieni

Deoarece între rezultatele testării in vitro și efectul terapeutic in vivo pot exista anumite diferențe, metodele de testare a sensibilității pot fi diferențiate în:

a. metode de testare a sensibilității in vitro

b. metode in vivo, care țin cont de relația agent terapeutic-infecție.

Metode de testare a sensibilității in vitro

Antibiograma face parte din prima categorie de metode menționate. Reprezintă metoda de laborator prin care se apreciază sensibilitatea la antibiotice a germenilor recoltați de la bolnavii cu infecții bacteriene, după cultivare pe medii speciale (de exemplu pe agar Mueller-Hinton).

Pentru antibiograme trebuie să folosim culturi pure (reprezentând o singură tulpină bacteriană), chiar în cazul infecțiilor multibacteriene. Cele mai frecvent utilizate tehnici sunt:

- Tehnicile calitative
  - antibiograma difuzimetrică comună (cu discuri)
  - antibiograma difuzimetrică comparativă
  - antibiograma difuzimetrică standardizată
  - antibiogramele difuzimetrice rapide
- Tehnicile cantitative
  - metoda diluțiilor în mediu lichid
  - metoda diluțiilor în agar
  - metoda microdiluțiilor în agar
  - metoda „punctelor de ruptură"
  - testul „E"
  - metode și sisteme comerciale, automatizate de testare etc.

Antibiograma difuzimetrică comună

Din punct de vedere tehnic însămânțăm germenul de testat pe mediul solid (ex. agar Mueller-Hinton) turnat în plăci Petri. Însămânțarea se poate realiza de exemplu prin „inundarea" plăcii urmată de aspirarea, aseptic, a excesului de inocul sau cu ajutorul unui tampon (există și alte variante tehnice). După circa 20 minute (timp în care placa Petri se lasă cu capacul întredeschis în vecinătatea becului de gaz, aprins) se aplică microcomprimatele în

care sunt încorporate antibiotice în concentraţie standardizată. Aplicarea microcomprimatelor se poate face cu ajutorul unei pense, în condiţii aseptice, sau cu ajutorului un aplicator „automat" (la minim 30 mm distanţă între ele şi minim 15 mm de marginea plăcii; vom utiliza 5 antibiotice diferite pentru o placă Petri cu diametrul de 9 cm). Microcomprimatele trebuie să vină în contact perfect cu mediul, motiv pentru care, cu ajutorul unei pense le presăm uşor (după caz). După încă 15-20 minute, incubăm plăcile peste noapte în termostat, la 28 sau 35-37°C, în funcţie de temperatura optimă de multiplicare a microorganismului testat. Antibioticul eliberat din microcomprimat difuzează în mediu, realizând zone de inhibiţie în care coloniile microbiene nu se dezvoltă. Cu cât zona de inhibiţie este mai largă, cu atât germenul va fi considerat mai sensibil. Dacă în interiorul zonei de inhibiţie (chiar dacă diametrul înregistrat este foarte mare) se dezvoltă colonii, „mutanţi rezistenţi", germenul va fi considerat rezistent.

Această metodă, cu toate că este folosită pe scară largă în laboratoare, permite de fapt numai eliminarea antibioticelor complet inactive şi eventual selecţionarea antibioticelor foarte active, pentru că tehnica nu este standardizată.

Antibiograma difuzimetrică comparativă (Stokes, Balş)

Se efectuează pentru microorganismul de testat în paralel cu un microorganism de referinţă, din aceeaşi specie (sau o specie asemănătoare). Spre exemplu, pentru cocii gram pozitivi putem alege pentru comparaţie o tulpină de *Staphylococcus spp.* Tulpina de referinţă are o sensibilitate cunoscută la diferitele antibiotice pe care le utilizăm.

Prin această metodă se înlătură o parte din factorii de eroare ai metodei precedente, spre ex. calitatea mediului, calitatea discurilor de antibiotice, care vor fi identice pentru microorganismul de referinţă şi pentru microorganismul testat. Rezultatele se exprimă cu termenii: „sensibil", „intermediar", „rezistent", în funcţie de diametrul zonelor de inhibiţie a multiplicării celor doi germeni, faţă de acelaşi antibiotic (jumătăţile de cerc se examinează comparativ). În cazul în care cunoaştem CMI (concentraţia minimă inhibitorie) a microorganismului de referinţă, putem face aprecieri cu privire la CMI pentru microorganismul testat.

Din punct de vedere tehnic, pe o placă de forma unui pătrat („împărţită" în 3 zone egale marcând pe partea externă a plăcii liniile de demarcaţie) se inoculează în treimea medie microorganismul de referinţă iar în treimile exterioare 2 microorganisme diferite, pentru care dorim să realizăm testarea. Inoculul trebuie să fie astfel realizat încât să conducă la apariţia după incubare a unor colonii foarte apropiate, dar care să nu fie confluente. Plasăm microcomprimatele cu antibiotice pe liniile de demarcaţie dintre culturi. Incubăm peste noapte la 35-37°C urmând ca în ziua următoare să citim şi interpretăm rezultatele.

Antibiograma difuzimetrică standardizată (Kirby-Bauer)

Din punct de vedere tehnic se realizează asemănător cu prima metodă prezentată, dar este standardizată, fiind singura metodă difuzimetrică recunoscută pe plan internaţional, care permite obţinerea unor rezultate reproductibile şi corelabile între laboratoare diferite.

Elementele necesare standardizării sunt:

- mediul (în majoritatea cazurilor agar Mueller-Hinton, pentru că are o valoare nutritivă corespunzătoare şi nu conţine substanţe cu acţiune inhibitoare);

- există elemente minerale care trebuie adăugate în cazul testării anumitor microorganisme (ex. Mg^{2+} şi Ca^{2+}, pentru tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, atunci când este testată sensibilitatea la aminoglicozide);
- se va verifica pH-ul mediului (de obicei cuprins între 7,2 şi 7,4);
- există suplimente nutritive care trebuie adăugate în cazul testării unor microorganisme pretenţioase;
- grosimea mediului trebuie să fie de 4 mm (25 ml de mediu/placă de 9 cm);
- inoculul, care se obţine de preferat din 5 colonii izolate (cultură pură) trebuie să aibă o turbiditate corespunzătoare standardului turbidimetric 0,5 McFarland (circa 10^8 unităţi formatoare de colonii/ml) în majoritatea cazurilor;
- timpul de incubare (în majoritatea cazurilor 16-18 ore la 35-37°C, nu mai mult de 2-3 plăci suprapuse), atmosfera de incubare, umiditatea atmosferei de incubare;
- concentraţia substanţelor antimicrobiene din microcomprimate şi dimensiunea microcomprimatelor (6 mm diametru);
- alegerea substanţelor antimicrobiene pentru care se face testarea;
- păstrarea plăcilor cu mediu până în momentul utilizării (maxim 7 zile, în pungi de polietilenă, la +4°C);
- utilizarea tulpinilor de referinţă pentru controlul de calitate;
- interpretarea rezultatelor (se măsoară diametrul zonei de inhibiţie şi se compară rezultatele cu cele din tabelele puse la dispoziţie de producători şi/sau centrele de referinţă).

Metodele difuzimetrice au dezavantajul că nu permit aprecierea concentraţiilor eficace ale antibioticului la nivelul focarului infecţios.

Metoda diluţiilor în mediu lichid

Oferă informaţii cu privire la CMI ale antibioticelor studiate, faţă de microorganismul testat. CMI = concentraţia minimă inhibitorie, reprezintă cea mai mică concentraţie de agent antimicrobian, exprimată în micrograme/ml, care mai exercită o acţiune bacteriostatică asupra germenului testat.

Din punct de vedere tehnic, pentru fiecare antibiotic avem nevoie de mai multe tuburi cu bulion Mueller-Hinton în concentraţii descrescânde (diluţii binare) pornind spre ex. de la 32 μg/ml şi până la 0,125 μg/ml, în total 8 tuburi, plus 2 tuburi martor, fără antibiotic (cantitatea finală va fi de 1 ml în fiecare tub). Preparăm un inocul standardizat turbidimetric şi în condiţii aseptice inoculăm toate cele 10 tuburi, cu câte 1 ml de inocul. Agităm pentru a omogeniza. Incubăm cele 8 tuburi cu antibiotice şi 1 tub martor timp de 16-20 ore la 35-37°C, iar al doilea tub martor îl menţinem pentru aceeaşi perioadă la temperatura frigiderului. Pentru controlul de calitate utilizăm şi un şir de tuburi pe care le inoculăm cu o tulpină de referinţă corespunzătoare. În ziua următoare citim şi interpretăm rezultatele. Deoarece am utilizat o cantitate de inocul egală cu cantitatea de mediu, concentraţia finală de antibiotic se va înjumătăţi (de ex. în tubul în care diluţia iniţială a fost de 32 μg/ml, diluţia finală va fi 16 μg/ml). În tubul martor menţinut la +4°C ar trebui să nu fie prezentă creşterea, în tubul martor menţinut la 35-37°C creşterea trebuie să fie prezentă. În tuburile inoculate cu tulpina de referinţă trebuie să avem rezultatul corespunzător datelor pe care le cunoaştem privitor la respectiva

B.C.U "M. EMINESCU" IASI

tulpină. În tuburile cu microorganismul testat, ultima diluţie care a inhibat dezvoltarea microorganismului corespunde CMI. Se consideră (în general, pentru că CMI diferă în funcţie de specia microbiană) că microorganismele în cazul cărora CMI este ≤3 μg/ml vor fi eficient inhibate de către antibioticul respectiv şi in vivo.

Determinarea CMB (concentraţia minimă bactericidă)

Pornind de la rezultatul obţinut prin metoda diluţiilor în mediu lichid, se vor utiliza ca sursă de inocul tuburile în care dezvoltarea microbiană a fost inhibată. Este necesară o placă Petri cu agar Mueller-Hinton care va fi împărţită în sectoare, numărul de sectoare fiind corespunzător numărului de tuburi fără creştere microbiană. Însămânţăm în condiţii aseptice din fiecare tub fără creştere microbiană, fiecare în sectorul de placă corespunzător. Incubăm pentru 16-18 ore la 35-37°C. CMB va corespunde ultimei concentraţii de antibiotic care a distrus microorganismele însămânţate (sectoare de placă fără apariţia culturii). Se consideră că antibioticul va fi eficient in vivo dacă în serul pacientului se pot atinge concentraţii de antibiotic care să depăşească de 4-8 ori CMB.

Determinarea CMI şi CMB este extrem de importantă pentru aprecierea eficacităţii antimicrobiene a unui antibiotic asupra unei tulpini bacteriene. Pentru tratamentul infecţiilor severe (de exemplu endocardite, meningite, septicemii etc), precum şi la imunodeprimaţi, efectuarea acestei metode este indispensabilă.

Determinarea CMI prin testul E (E test)

E test reprezintă o metodă de testare *in vitro* a sensibilităţii la antibiotice pentru diferite microorganisme, inclusiv pentru bacteriile pretenţioase şi germenii anaerobi. **E test** se aseamănă metodei diluţiei în agar combinând principiile metodei difuzimetrice cu cele de diluţie. **E test** este uşor de utilizat şi spre deosebire de metoda difuzimetrică permite determinarea valorii CMI.

Principiu:

Asemănător metodei difuzimetrice, E test necesită un inocul bacterian ajustat ca turbiditate (standardizat), ce urmează a fi depus pe mediul de cultură potrivit microorganismului studiat (ex. mediul Mueller-Hinton, geloză sânge etc), în plăci Petri. Benzile Etest conţin un gradient de agent antimicrobian se aplică după însămânţare. În funcţie de antibiotic, gradientul acoperă un şir continuu de concentraţii între 0,002-32 μg/ml; 0,016-256 μg/ml sau 0,064-1024 μg/ml. După incubare (timp de 16-18 ore la 35-37°C) se formează o zonă eliptică de inhibiţie. Valoarea CMI se citeşte acolo unde creşterea bacteriană intersectează banda Etest.

Materiale şi reactivi necesari:

- plăci Petri cu agar Mueller Hinton (păstrate la 2-8°C până în momentul utilizării);
- bulion Mueller Hinton (cu 20-25 mg cationi de calciu şi 10-12,5 mg cationi de magneziu/litru; se repartizează câte 5 ml în tuburi sterile cu capac; se păstrează la 2-8°C);
- medii de cultură pentru menţinerea în stare viabilă a tulpinilor bacteriene necesare efectuării controlului de calitate;
- tulpini martor;
- inocul bacterian;
- soluţie salină sterilă (0,85% NaCl) sau bulion Mueller Hinton, pentru ajustarea inoculului bacterian;

- benzi Etest (a. cu agenţi antimicrobieni cu nucleu β lactam, b. cu alţi agenţi antimicrobieni); se păstrează în congelator la -20°C; au o durată de utilizare de 1-2 ani (pentru prima grupă) şi respectiv de 2-3 ani.
- tampoane sterile;
- standard de turbiditate McFarland de 0,5 şi 1,0;
- pipete Pasteur sterile;
- foarfece;
- plăci Petri sterile cu diametrul de 90 mm şi respectiv de 150 mm;
- incubator cu atmosferă obişnuită reglat la 34-35°C; incubarea în atmosferă îmbogăţită cu CO_2 este necesară în cazul testării anumitor microorganisme;
- sursă de lumină;
- aplicator Etest şi bandă adezivă (opţional).

Tehnica de lucru:

A. Benzile Etest

- scoatem plăcile cu mediul de cultură şi benzile Etest din congelator, le lăsăm la temperatura camerei pentru echilibrare termică timp de 20 minute sau până când nu mai observăm nici o urmă de umezeală;
- înainte de a deschide folia care include benzile, inspectăm pentru a observa dacă există perforări; dacă folia respectivă nu este intactă, atunci benzile din interiorul ei nu se mai pot folosi; dacă nu sunt probleme, pentru a deschide o folie mai intâi tăiem cu o foarfecă de-a lungul liniei întrerupte apoi între compartimentele ce conţin benzile;
- scoatem benzile din folie cu ajutorul unei pensete şi le punem în plăci Petri sterile; apoi le putem aplica pe mediul de cultură care conţine inoculul microbian de testat;
- păstrăm restul benzilor în tuburi în care introducem o substanţă desicantă pentru a le proteja faţă de umezeală; este necesară protecţia şi faţă de căldură şi expunerea directă la lumină (punem tuburile în congelator, la -20°C).

B. Inoculul bacterian:

- cu ajutorul ansei sau a unei pipete, transferăm mai multe colonii dintr-o cultură bacteriană de 18-24 de ore într-un tub cu soluţie salină sterilă sau bulion; omogenizăm (există şi varianta să transferăm mai multe colonii în bulion, să incubăm timp de 2-8 ore până când obţinem densitatea dorită);
- ajustăm (vizual) densitatea folosind soluţie salină sterilă 0,85% sau bulion, la un standard de turbiditate echivalent cu 0.5 McFarland; alternativ, suspensia se poate ajusta la standardul dorit cu ajutorul unui nefelometru (aprecierea vizuală a turbidităţii inoculului nu garantează numărul corect al unităţilor formatoare de colonii).

C. Inocularea plăcilor:

- introducem tamponulul steril în tubul care conţine suspensia bacteriană de testat, rotim de câteva ori, apoi eliminăm excesul de lichid prin presarea tamponului de pereţii interiori ai tubului;
- depunem inoculul pe suprafaţa plăcii cu mediul de cultură având grijă să acoperim complet suprafaţa mediului (ex. inoculăm pe 3 direcţii diferite, rotind placa cu câte o treime);

- lăsăm placa timp de circa 10 minute, ca să se usuce, înainte de a aplica benzile Etest.

D. Aplicarea benzilor Etest:

- luăm cu grijă o bandă fără să atingem sau zgâriem partea pe care este depus agentul antimicrobian; dacă folosim pensa sterilă, apucăm cu grijă de capătul benzii notat cu E (benzile trebuie să fie complet separate una de cealaltă înainte de a le aplica pe suprafaţa mediului de cultură inoculat cu tulpina de testat); dacă se foloseşte aplicatorul Etest, banda adezivă trebuie să fie în poziţia corectă (la fiecare capăt al aplicatorului);
- aplicăm banda Etest pe suprafaţa mediului de cultură, cu capătul ce conţine concentraţia cea mai mare aproape de marginea plăcii;
- dacă lucrăm cu plăci cu diametrul de 90 mm, aplicăm una sau două benzi; dacă lucrăm cu plăci cu diametrul de 150 mm, putem aplica şase benzi Etest (benzile se pun la distanţe egale, radial, pornind din centrul plăcii; marginea capătului benzii notată cu E trebuie să atingă marginea plăcii);
- banda trebuie să fie în contact cu suprafaţa agarului; eliminăm eventualele bule de aer de sub bandă cu ajutorul unei pense începând de la marginea bulei şi mutând-o în sus pe gradient până la capătul notat cu E (prezenţa bulelor mici nu va afecta rezultatul testării);
- banda aplicată pe suprafaţa agarului nu se mută în altă poziţie (luând contact cu mediul de cultură, agentul antimicrobian de pe partea posterioară se eliberează imediat); dacă banda a fost aplicată cu partea posterioară în sus atunci se apucă cu grijă, se întoarce şi se pune corect pe suprafaţa mediului; dacă banda a atins suprafaţa mesei de lucru sau un alt obiect, se poate folosi în continuare atâta timp cât nu a luat contact cu o substanţă lichidă;

E. Incubarea:

- timpul şi temperatura de incubare depind de combinaţia microorganism-agent antimicrobian ce urmează a fi testate;
- incubarea în atmosferă de CO_2 modifică pH-ului mediului de cultură şi poate afecta activitatea agenţilor antimicrobieni; se foloseşte numai în cazul în care microorganismele supuse testării necesită pentru multiplicare CO_2 *(Haemophilus spp., Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae* etc).

Interpretarea rezultatelor:

- putem citi rezultatul în cazul în care creşterea bacteriană este confluentă sau aproape confluentă;
- ţinem placa lângă o sursă de lumină (atunci când mediul este Mueller-Hinton); citim valoarea CMI în punctul în care creşterea bacteriană intersectează banda Etest; dacă am utilizat agar Mueller Hinton suplimentat cu 5% sânge de oaie, sau geloză şocolat Mueller Hinton sau alt mediu opac, vom utiliza pentru citirea rezultatului o sursă de lumină reflectantă şi o lupă;
- pe geloză-sânge citim zona de inhibiţie a creşterii bacteriene nu zona de inhibiţie a hemolizei;

- în cazul în care nu apare nici o zonă de inhibiție, raportăm valoarea CMI ca fiind mai mare decât cea mai mare concentrație a agentului antimicrobian de pe banda Etest; dacă zona de inhibiție nu intersectează banda (zona de inhibiție se află sub banda Etest), valoarea CMI se raportează ca fiind mai mică decât concentrația cea mai scăzută a agentului antimicrobian de pe banda Etest;
- în cazul unei valori CMI situată între două marcaje ale gradientului benzii, rezultatul pe care îl notăm va fi valoarea cea mai mare;
- raportăm rezultatul obținut pentru tulpina studiată după ce verificăm rezultatul obținut pentru tulpina de referință (control de calitate);
- rezultatele CMI se interpretează conform criteriilor stabilite de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Alte metode de testare

- Testarea sensibilității la antibiotice a bacteriilor anaerobe:
  - metodele sunt utile în special din punct de vedere al supravegherii epidemiologice, dar sunt rezervate pentru laboratoarele de referință;
  - se pot utiliza tehnici de diluție în mediu lichid sau solid, tehnici de microdiluții în mediu lichid, testul E, teste pentru producerea de β-lactamază etc.
- Testarea sensibilității mycobacteriilor:
  - se efectuează respectând prevederile Programului național de control al tuberculozei (care indică situațiile în care vor fi efectuate aceste testări);
  - se pot utiliza metoda concentrațiilor absolute, metoda proporțiilor, metoda rapoartelor de rezistență, metode radiometrice etc.
- Testarea sensibilității altor bacterii:
  - există și alte bacterii pentru care trebuie respectate condiții particulare;
  - spre exemplu pentru testarea sensibilității stafilococilor la oxacilină/meticilină se recomandă ca mediul să conțină 4% NaCl, pentru testarea sensibilității la antibiotice a streptococilor se recomandă ca mediul să conțină 5% sânge defibrinat de berbec etc.
- Testarea sensibilității fungilor (antifungigrama):
  - ține cont de temperatura și durata de incubare, care diferă față de cele pentru bacterii, mediul utilizat fiind mediul Sabouraud;
  - se pot utiliza tehnici de diluție în mediu lichid sau solid.
- Testarea producerii de β-lactamaze:
  - este utilă atunci când se verifică sensibilitatea la antibiotice a microorganismelor care pot produce β-lactamază (ex. *Haemophilus spp., Staphylococcus aureus* etc);
  - se pot utiliza teste iodometrice, teste acidimetrice, teste cu cefalosporine cromogene etc; există și metode puse la punct pentru testarea sintezei de β-lactamaze cu spectru extins (BLSE).

Există şi sisteme automate (ex. ATB şi rapid ATB) sau sisteme semiautomate (ex. ATB Expression sau miniAPI), pentru testarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice, utilizând criteriile de interpretare NCCLS.

Metode de testare a sensibilităţii in vivo şi de apreciere a eficienţei terapeutice

Eficienţa terapeutică poate fi apreciată clinic, paraclinic şi prin teste de laborator. Există unele criterii nespecifice de laborator care sunt utile în aprecierea eficienţei terapeutice, precum leucograma, examenul sedimentului urinar, examenul citologic al LCR, VSH, proteina C reactivă etc.

Dintre metodele specifice utilizate pentru apreciera eficacităţii terapeutice sau pentru evaluarea eventualei nocivităţi a medicamentelor folosite, vom enumera:

- determinarea NEI (nivel de eficienţă inhibitorie) pentru ser, LCR sau alte umori;
- determinarea NEB (nivel de eficienţă bactericidă) pentru ser, LCR sau alte umori; puterea bactericidă a serului celor trataţi (NEB) măsoară capacitatea diluţiilor din serul unui bolnav tratat cu antibiotice de a inactiva un inocul conţinând germenul infectant; se determină diluţia cea mai înaltă de ser care mai manifestă capacitate bactericidă;
- determinarea nivelul de antibiotic realizat în sânge, LCR sau în alte umori (prin metode microbiologice, enzimatice, HPLC etc).

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITARĂ

15. REACȚII ANTIGEN-ANTICORP UTILIZATE ÎN MICROBIOLOGIE

Bazele moleculare ale interacțiunii Ag-Ac

Reacţia dintre antigen (Ag) şi anticorp (Ac) necesită interacţiunea determinantului antigenic (epitop) cu situsul de combinare al anticorpului (paratop).

Factorii care condiţionează interacţiunea Ag-Ac sunt:

- complementaritatea structurală dintre epitop şi paratop (reacţia este **specifică**); complementaritatea presupune adaptarea conformaţională a celor două grupări, de tipul „cheie în broască";

- complementaritatea electrochimică a grupărilor care intră în reacţie este o consecinţă a complementarităţii structurale; pentru stabilizarea legăturii intră în acţiune forţe intermoleculare, care sunt legături necovalente, forţe nespecifice cu valoare mică, spre exemplu

- legături de hidrogen/energie de legare 3-7 kcal/mol;
- forţe electrostatice (coulombiene sau ionice)/energie de legare 5 kcal/mol;
- legături van der Waals/energia de legare 1-2 kcal/mol;
- legături hidrofobe.

Complementaritatea structurală sau forţele intermoleculare nu sunt suficiente fiecare în parte, pentru a forma legături stabile; este necesară îndeplinirea ambelor condiţii. Cu cât energia de legare a reactanţilor este mai mare, cu atât complexele Ag-Ac sunt mai stabile.

Interacţiunea dintre epitop şi paratop este definită de 2 parametri (afinitatea şi aviditatea anticorpilor).

- Afinitatea măsoară forţa de legare dintre epitop şi paratop. Afinitatea este rezultanta forţelor de atracţie şi de respingere care mediază interacţiunea celor doi reactanţi. O interacţiune cu afinitate înaltă presupune structuri complementare perfecte, în timp ce complementaritatea imperfectă a grupărilor reactante determină o afinitate scăzută, deoarece forţele de atracţie sunt active numai pe distanţe foarte mici şi sunt diminuate de forţele de respingere. Afinitatea anticorpilor se poate măsura prin dializa la echilibru.
- Aviditatea este un parametru al interacţiunii Ag-Ac care rezultă din multivalenţa Ag. Cele mai multe Ag. posedă mai mult decât un epitop. De exemplu, bacteriile, polizaharidele etc. au pe suprafaţă un număr mare de epitopi repetitivi. Ag. proteice au epitopi multipli, dar diferiţi. Antigenele multivalente leagă un număr echivalent de molecule de anticorpi. Energia totală de legare a epitopilor multipli ai unui Ag, cu paratopii specifici este mult superioară în comparaţie cu energia separată a fiecărei interacţiuni dintre epitop şi paratop. Aviditatea caracterizează energia medie de legare a unui Ag multivalent cu Ac specifici şi măsoară forţa rezultantă a afinităţii dintre epitopii multipli ai unui Ag şi paratopii complementari. Complexele Ag-Ac formate de

antigenele multivalente sunt stabile, disocierea lor fiind dificilă, deoarece este necesară ruperea tuturor legăturilor existente.

Reacții încrucișate

În anumite cazuri pot avea loc reacţii încrucişate; un Ag reacţionează cu un Ac care a fost sintetizat faţă de un alt Ag (aceste reacţii pot apărea de ex. datorită faptului că anumite Ag posedă anumite grupări determinante comune). Spre exemplu, serul imun anti-polizaharid capsular de *Streptococcus pneumoniae* aglutinează eritrocitele umane de grup A (cu specificitate antigenică conferită de N-acetil-galactozamină), iar serul imun anti-*Escherichia coli* aglutinează eritrocitele umane de grup B (cu specificitate antigenică conferită de galactoză). Nu vom detalia aceste aspecte în materialul de faţă.

Stadiile reacțiilor antigen-anticorp

- Interacţiunea primară se datorează legării efective a Ac de Ag şi depinde în mod direct de cantitatea şi afinitatea Ac. Din punct de vedere diagnostic, reacţiile Ag-Ac în care reactanţii se află în interacţiune primară pot fi puse în evidenţă prin nefelometrie. În cazul tipurilor de reacţii care vor fi discutate în capitolele următoare, interacţiunea primară nu devine vizibilă (complexele Ag-Ac sunt de dimensiuni mici, solubile şi se pot desprinde uşor). In vivo aceste interacţiuni sunt spre exemplu necesare şi suficiente în vederea neutralizării unor exotoxine circulante (difterică, botulinică etc), pentru inhibarea activităţii unor bacterii sau virusuri, sau în declanşarea unor reacţii de hipersensibilitate (ex. în reacţia de hipersensibilitate de tip I).
- Interacţiunile secundare apar la circa 30 de minute după interacţiunile primare. Datorită faptului că Ag poate avea mai mulţi epitopi iar Ac are minim 2 paratopi complexele primare mici, solubile, interacţionează între ele formând complexe secundare, produsul final fiind un complex Ag-Ac ca o reţea tridimensională, insolubil, mult mai stabil decât complexele primare. Din punct de vedere diagnostic, reacţiile Ag-Ac în care reactanţii se află în interacţiune secundară pot fi puse în evidenţă prin tehnici care vor fi enumerate în finalul acestui capitol şi discutate în capitolele următoare. In vivo, manifestările interacţiunilor secundare sunt dependente de natura reactanţilor şi de condiţiile de reacţie.
- Interacţiunile terţiare definesc manifestările in vivo ale reacţiilor Ag-Ac şi depind în special de anumite variabile care sunt caracteristice gazdei. Interacţiunile terţiare pot conduce la un rezultat pozitiv (protecţia gazdei) sau negativ (degradare tisulară).

Tipuri de reacții Ag-Ac

În funcţie de natura antigenului, metodele aplicate pentru vizualizare, scopul urmărit există mai multe tipuri de reacţii Ag-Ac, după cum urmează:

- reacţii de precipitare
  - pot avea loc în gel (imunodifuzia radială simplă Mancini, dubla difuzie Ouchterlony etc) sau

- pot avea loc în mediu lichid (reacţia Ramon, precipitarea în inel Ascoli etc)
- reacţii de aglutinare
  - se pot folosi în diagnosticul bacteriologic (ex. reacţia Huddleson) sau
  - se pot folosi în diagnosticul serologic (ex. reacţia Wright)
- reacţia de fixare a complementului (RFC)
  - în diagnosticul serologic al sifilisului, leptospirozei etc
  - în diagnosticul serologic al infecţiilor virale etc
- reacţii de seroneutralizare
  - reacţia ASLO (în diagnosticul serologic al infecţiilor streptococice)
  - diferite intradermoreacţii cu mecanism imun umoral etc
- reacţii în care componentele sunt marcate
  - izotopic (radio immuno assay, RIA)
  - enzimatic (enyzme linked immuno assay, ELISA)
  - fluorescent (fluorescent immunoassay, FIA)
  - chemiluminiscent (chemiluminiscent assay, CLA).

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16. REACȚIA DE PRECIPITARE

Reacţia Ag-Ac de precipitare poate avea loc în mediu lichid sau solid şi constă în unirea Ag **solubile** cu Ac specifici, rezultând complexe antigen-anticorp, care nu devin insolubile şi stabile decât în cazul formării unei reţele tridimensionale, conform teoriei reţelei care presupune: un Ag cel puţin trivalent pentru amplasarea Ac, un Ac bivalent şi condiţii fizice favorabile precipitării (ex. Ac puţin glicozilaţi, de tip IgG cu 3% glucide, superiori Ac de tip IgM cu 10% glucide).

Reacţia de precipitare este sensibilă şi specifică în evidenţierea prezenţei Ag (pentru realizarea reţelei Ag-Ac este necesar ca în reacţie să intre o anumită „cantitate" de Ag şi Ac, care să se găsească într-un anumit raport/proporţie, iar Ag care participă la formarea agregatelor sunt într-o cantitate proporţional mai mică, în raport cu Ac). În cadrul cursului se discută diferitele situaţii legate de prezonă (exces de Ac), exces relativ de Ac, zona de echivalenţă (Ag şi Ac se găsesc „în totalitate" în precipitat), exces relativ de Ag şi respectiv postzonă (exces de Ag). Pentru anumite sisteme Ag-Ac va fi definită şi noţiunea de proporţie optimă.

Clasificarea reacțiilor de precipitare

Reacţiile de precipitare se pot clasifica după cum urmează.

Reacţii de precipitare în mediu lichid

- Reacţii de precipitare în amestec, reacţii de floculare;
  - titrarea toxinei difterice (metoda Ramon), determinarea titrului Ac antitoxici etc;
  - VDRL (Veneral Disease Research Laboratory), USR (Unheated Serum Reagin), RPR (Rapid Plasma Reagin) etc, în diagnosticul serologic al sifilisului.
- Reacţii de precipitare în inel
  - reacţia Ascoli, determinarea grupului streptococic etc.
- Reacţii de precipitare în tub capilar
  - determinarea prezenţei proteinei C reactive;
  - determinarea prezenţei tipului M streptococic (streptococi de grup A) etc.
- Dozajul nefelometric etc

Reacţii de precipitare în mediu gelifiat

- Imunodifuzia radială simplă (ex. metoda Mancini)
- Difuzia dublă
  - metoda Elek
  - difuzia dublă radială (Ouchterlony)

Reacţii de precipitare în care difuzia în gel este combinată cu migrarea în câmp electric

- Imunoelectroforeza;
- Contraimunoelectroforeza;
- Electroforeza urmată de imunofixare;
- Electroimunodifuzia.

Reacţii de precipitare în mediu lichid

Au la bază unirea Ag cu Ac în mediul lichid, formându-se complexe Ag-Ac, care vor precipita atunci când Ag şi Ac se găsesc în anumite proporţii.

Reacţii de precipitare în amestec

Reacţia de precipitare între Ag şi Ac se poate cuantifica şi este foarte utilă pentru a demonstra prezenţa şi respectiv absenţa precipitatului în funcţie de concentraţiile relative de Ag şi Ac. Spre exemplu pentru **titrarea toxinei difterice (Ramon)** se pun în contact, în amestec în tuburi, cantităţi egale din componenta care trebuie titrată (toxina difterică, Ag) cu cantităţi variabile de Ac la care titrul este cunoscut. Cantitatea maximă de precipitat se găseşte în tubul unde există raportul de echivalenţă. Pentru sistemul toxină difterică – anticorpi anti-toxină difterică (ca şi în cazul sistemului toxină tetanică – anticorpi anti-toxină tetanică), raportul de echivalenţă se „suprapune" peste proporţia optimă, astfel încât se poate observa relativ uşor tubul în care apare cantitatea cea mai importantă de precipitat. Cunoscând titrul anticorpilor, se află imediat titrul toxinei (1 Lf = *1 limes floculans* = cantitatea de toxină care se combină cu o unitate de antitoxină = 1 UA = 1 unitate antitoxică). Dacă spre exemplu precipitarea maximă apare în tubul în care titrul anticorpilor este de 10 UA, titrul toxinei este de 10 Lf.

În mod asemănător, prin metoda **Dean** şi **Web** se poate **determina titrul anticorpilor anti-toxici,** cunoscând titrul toxinei.

Reacţii de precipitare în inel

Reacţia de precipitare în inel, constă în punerea în contact a Ag şi Ac astfel încât să nu se amestece; reacţia care apare la interfaţa dintre Ag şi Ac se concretizează printr-un inel de precipitare albicios. Se utilizează pentru identificarea originii petelor de sânge (reacţia Uhlenhut, în medicina legală) şi pentru identificarea provenienţei unor preparate pe bază de carne (în industria alimentară).

Demonstrativ, în cursul lucrărilor practice, reacţia de precipitare în inel (reacţia Ascoli) se poate utiliza pentru identificarea prezenţei antigenului cărbunos (Ag obţinut de la *Bacillus anthracis).* Istoric, soluţia de antigen se prepara pornind de la organe (de ex. splină) recoltate de la un animal care a decedat şi pentru care se suspecta că decesul a fost produs de o infecţie generalizată cu *Bacillus anthracis.* Fragmentul de organ se mojara în soluţie de clorură de sodiu sterilă, adăugându-se ulterior câteva picături de acid acetic, apoi se menţinea la temperatura de fierbere timp de 5-10 minute. După decantarea şi alcalinizarea cu NaOH, urma filtrarea şi rezulta soluţia antigenică. Din punct de vedere tehnic vom utiliza 3 tuburi, 1 pentru reacţie şi 2 tuburi martor. În primul tub martor vom pipeta 0,5 ml ser anticărbunos şi 0,5 ml soluţie salină fiziologică iar în al doilea tub martor vom pipeta 0,5 ml ser normal de cal şi 0,5 ml soluţie de anti-

gen. În ceea ce priveşte tubul de reacţie trebuie să pipetăm întâi 0,5 ml din serul anticărbunos, urmând ca soluţia de antigen (în cantitate de 0,5 ml) să fie pipetată foarte lent, eventual prin „scurgere picătură cu picătură" pe peretele interior al tubului, în aşa fel încât cele 2 soluţii să nu se amestece. În cazul reacţiei pozitive (prezenţa Ag cărbunos în soluţia antigenică), după circa 5 minute, la interfaţa dintre cei 2 reactivi apare un „inel" de precipitare.

Reacţii de precipitare în mediu gelifiat

Utilizarea gelozei, în care pot să migreze cei doi reactivi (se va utiliza o anumită concentraţie de agar în soluţie de tampon veronal, în aşa fel încât porii gelului să permită migrarea), va duce la vizualizarea reacţiei Ag-Ac printr-un arc/linie de precipitare.

Imunodifuzia radială simplă (IDRS Mancini)

Imunodifuzia radială simplă (Mancini) se bazează pe difuzia spontană şi radială a Ag din proba de cercetat, într-un gel care conţine o cantitate constantă de anticorpi, determinând apariţia unui cerc de precipitare al cărui diametru este direct proporţional cu concentraţia de antigen din probă. Pentru a obţine un cerc de precipitare de mărime convenabilă, concentraţia Ac înglobaţi în gel trebuie să fie aleasă în funcţie de titrul acestora şi de concentraţia Ag care urmează a fi testat. Metoda permite determinarea cantitativă a imunoglobulinelor (IgG, IgM, IgA), fracţiunii C3 a complementului, alfa1-antitripsinei, siderofilinei etc.

Sunt necesare plăcuţe (de ex. cu diametrul de 5 cm) în care se toarnă un gel care include Ac faţă de structura a cărei concentraţie dorim să o determinăm. Există un cod al culorilor şi spre exemplu, plăcuţele care vor fi utilizate pentru determinarea concentraţiei de IgG au culoare roşie, pentru IgA culoarea este albastră, pentru siderofilină culoarea este portocalie etc. În gel sunt perforate mici godeuri (3 mm diametru). Sunt necesare seruri de cercetat şi un ser de referinţă în care se cunoaşte concentraţia diferitelor componente (spre ex. câte 100 UI/ml pentru fiecare dintre cele 3 imunoglobuline). Înainte de pipetarea serurilor în godeuri se realizează diluarea acestora, diluţia fiind 1/4 pentru IgG, IgA şi siderofilină şi respectiv 1/2 pentru IgM, complement C3 şi alfa1-antitripsină. Diluţia serului de referinţă se face în funcţie de proteina care urmează a fi determinată. Cantitatea de ser introdusă în fiecare godeu este de 5 µl (un godeu pentru serul de referinţă şi restul pentru serurile de cercetat).

După 10 minute de menţinere a plăcuţei pe masa de lucru aceasta se incubează la 37°C, cu stratul de gel poziţionat în sus, timp de 48 ore pentru IgA şi IgM şi respectiv 24 de ore pentru celelalte componente. Citirea se realizează cu ajutorul unei rigle gradate, din plastic, o riglă specială pentru această analiză (demonstrat în cursul lucrărilor practice). Se va măsura iniţial diametrul cercului de precipitare din jurul godeului în care se află serul de referinţă iar rezultatul obţinut trebuie să corespundă aşteptărilor (de ex. 6 mm pentru IgG care a fost diluat 1/4 şi astfel are concentraţia de 25 UI/ml). În cazul că rezultatul este cel aşteptat, se poate face direct citirea diametrelor cercurilor de precipitare pentru serurile de cercetat; în caz contrar este necesară o „corecţie" (dacă spre exemplu diametrul este 6,5 mm în loc de 6 mm, din valoarea obţinută pentru serurile de cercetat se scad 0,5 mm). După citirea diametrelor, se compară rezultatele cu cele puse la dispoziţie în tabele, iar cifra obţinută se înmulţeşte cu diluţia probei (spre ex. dacă obţinem o valoare de 50 UI/ml pentru IgG, vom înmulţi cu 4 pentru a obţine rezultatul real).

Imunodifuzia dublă radială (Ouchterlony)

Imunodifuzia dublă se bazează pe difuzia Ag şi Ac (unul spre celălalt) într-un gel. Deoarece mărimea moleculelor de Ag şi Ac este mai mică decât diametrul porilor gelului, iar distanţa parcursă de reactant într-un anumit timp este direct proporţională cu gradientul concentraţiei sale şi invers proporţională cu greutatea sa moleculară, migrarea reactanţilor unul spre celălalt determină formarea unor linii de precipitare la locul de întâlnire Ag-Ac. În gelul transparent vor apărea linii opace, numărul lor corespunzând numărului sistemelor Ag-Ac studiate.

Metoda certifică prezenţa sau absenţa proteinei cercetate. Se pot evidenţia alfa-fetoproteina, proteina C reactivă, beta-2 microglobulina, proteine Bence-Jones tip kappa şi lambda, produşi de degragare ai fibrinogenului etc. În micologie, prin imunodifuzie se poate identifica prezenţa exoantigenelor fungice *(Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatidis, Coccidioides immitis* etc) sau prezenţa Ac faţă de Ag fungice, spre exemplu în diagnosticul serologic al unei aspergiloze invazive. Această metodă este încă frecvent utilizată pentru determinarea specificităţii anticorpilor antinucleari sau a altor anticorpi în patologia umană.

Sunt necesare lame de microscop pe care se toarnă un gel de agar 1%, lama putând fi folosită pe parcursul unei zile (dacă acest lucru nu se poate îndeplini, lama trebuie păstrată în cameră umedă, la temperatura frigiderului, pentru maxim o săptămână). În gelul de pe lamă se perforează 3 grupe de godeuri, câte 7 godeuri în fiecare grup (1 godeu central şi 6 godeuri periferice, fiecare cu diametrul de 3 mm). Dacă spre exemplu dorim să determinăm prezenţa proteinei C reactivă (CRP) în seruri de cercetat, avem nevoie de un ser cu Ac anti-CRP, seruri de cercetat şi un ser de referinţă care conţine CRP. Numerotând godeurile periferice, pipetăm Ac anti-CRP în godeul central şi ser de referinţă cu CRP în godeurile 1 şi 4. În celelalte godeuri pipetăm serurile de cercetat. Incubăm la 37°C, timp de 24 de ore, în cameră umedă (într-o cutie Petri putem pune o bucată de vată îmbibată în soluţie salină fiziologică, alături de lama respectivă). Liniile de precipitare pot deveni vizibile după 2-4 ore dar sunt mult mai clare după 24 de ore.

Pentru citire poate fi necesară o lupă şi o sursă de lumină. Între godeul central şi godeurile 1 şi 4 (martori pozitivi) vor apărea linii (arcuri) de precipitare. În cazul în care de ex. în godeul 2 există CRP, va apărea un arc de precipitare şi între godeul central şi godeul nr. 2. Este certificată prezenţa CRP în cazul în care cele 2 linii de precipitare (dintre godeul central şi godeurile 1 şi 2) sunt una în continuarea celeilalte (imagine de „genunchi îndoit").

Dubla difuzie Elek

Această metodă permite depistarea capacităţii toxigene a unei tulpini de *Corynebacterium diphteriae*. În cazul în care tulpina este toxigenă, toxina va difuza în mediu, iar după unirea cu Ac anti-toxină, complexele Ag-Ac vor da naştere unor linii de precipitare.

Într-o cutie Petri turnăm mediul Elek şi după ce mediul s-a întărit, decupăm un şanţ pe unul din diametre. În şanţul respectiv pipetăm 0,5 ml ser antidifteric, ser care conţine Ac anti-toxină difterică în concentraţie de 1.000 UI/ml. Ac anti-toxină difterică vor difuza în mediu. După circa 2 ore însămânţăm perpendicular pe şanţul cu Ac anti-toxină, de fiecare parte a şanţului, o tulpină de *Corynebacterium diphteriae* toxigenă (martor pozitiv), o tulpină de *Corynebacterium diphteriae* ne-toxigenă (martor negativ) şi tulpini de cercetat, câte un striu (de fiecare parte a şanţului) pentru fiecare tulpină. Incubăm la 37°C pentru 48 ore, dar urmărim zilnic apariţia culturii şi precipitatului (liniilor de precipitare). De-a lungul liniilor de însămânţare apare cultură bacteriană. Din cultura de *Corynebacterium diphteriae* toxigen, toxina (Ag) difuzează în mediu. Unirea dintre Ag şi Ac duce

la formarea unor complexe Ag-Ac care precipită, iar în mediu vor apărea linii de precipitare în unghiurile dintre cultură şi şanţul cu Ac anti-toxină. În cazul în care apar linii de precipitare în unghiul dintre una dintre tulpinile de cercetat şi şanţul cu Ac anti-toxină, respectiva tulpină este toxigenă. Reacţia va fi negativă pentru martorul negativ şi pentru tulpinile de cercetat ne-toxigene.

Reacţii de precipitare în care difuzia în gel este combinată cu migrarea în câmp electric

Electroforeza proteică în gel

Electroforeza proteică în gel este folosită în laboratorul de imunochimie pentru decelarea unor proteine patologice. Deplasarea proteinelor într-un strat de gel care este supus acţiunii unui câmp electric se va realiza diferenţiat, pentru fiecare structură proteică în parte, în funcţie de greutatea moleculară şi încărcătura electrică a proteinelor. Pentru vizualizare este necesară fixarea, uscarea şi colorarea liniilor de precipitare care corespund fracţiunilor proteice din serul normal sau unor eventuale proteine patologice (ex. o componentă monoclonală).

Imunoelectroforeza

Se asociază electroforeza în gel cu imunodifuzia dublă (realizându-se separarea prin electroforeză a proteinelor în mediu gelozat, urmată de o imunodifuzie dublă utilizând un antiser corespunzător). Reacţia Ag-Ac se va vizualiza prin apariţia unor arcuri de precipitare. Este o metodă foarte utilă în studierea purităţii unui Ag (sau Ac), însă în mod curent are indicaţii didactice. Datorită faptului că în boala pneumococică prin urină se elimină cantităţi destul de importante de Ag K, prezenţa acestuia poate fi evidenţiată de ex. prin imunoelectroforeză.

Contraimunoelectroforeza

Contraimunoelectroforeza reprezintă o dublă difuzie în care deplasarea unul faţă de celălalt a Ag şi Ac este accelerată de un câmp electric. Pe o lamă de microscop se toarnă un gel de agar 1% şi se perforează 3 grupe de perechi de godeuri, faţă în faţă. Metoda poate fi utilizată pentru acele structuri antigenice care în câmp electric migrează către anod. Luând în discuţie spre exemplu doar una dintre cele 3 grupe de perechi de godeuri, în godeurile care vor fi poziţionate spre catod (polul negativ) pipetăm Ag iar în godeurile care vor fi poziţionate spre anod (polul pozitiv) pipetăm Ac cunoscuţi, specifici Ag pe care dorim să-l identificăm. Reacţia este mai rapidă şi mai sensibilă decât dubla difuzie deoarece migrarea celor doi reactanţi unul către celălalt este amplificată de câmpul electric. Reacţia (apariţia unei linii de precipitare între godeuri, în cazul în care în godeul catodic se găseşte Ag presupus) poate fi citită după numai 30-90 minute în loc de 24 de ore aşa cum se întâmplă în dubla difuzie Ouchterlony. Metoda a fost utilizată din punct de vedere istoric pentru identificarea prezenţei Ag HBs. Se poate utiliza pentru identificarea antigenelor capsulare în lichidul cefalorahidian la pacienţi cu meningită acută *(Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae).*

Electroimunodifuzia

Electroimunodifuzia are la bază electroforeza probelor care conţin proteina-antigen, într-un strat de gel, care conţine o cantitate constantă de anticorpi monospecifici (anti-proteină antigen), rezultând zone de precipitare în formă de rachetă sau conuri, a căror arie este direct proporţională cu concentraţia antigenului. Metoda are o sensibilitate mai mare decât IDRS.

17. REACȚIA DE AGLUTINARE

În reacţia de aglutinare antigenele sunt de **natură corpusculară.** Reacţia de aglutinare constă în reacţia Ac cu Ag (natural sau artificial) de pe suprafaţa unor particule (bacterii, hematii, latex, cristale de colesterol etc), determinând aglutinarea acestora prin scăderea forţelor electrostatice de repulsie dintre particule şi formarea unor punţi de legătură.

Aglutinarea este mai sensibilă decât precipitarea, Ag fiind o particulă şi nu o moleculă solubilă. Anticorpii de tip IgM sunt mai aglutinanţi decât Ac de tip IgG (pentru că au mai multe valenţe). Există şi Ac neaglutinanţi (incompleţi/blocanţi) sau care aglutinează numai la rece.

Câteva tipuri de aglutinare

Există mai multe variante tehnice de aglutinare. Dintre acestea vom prezenta în continuare, pe scurt, aglutinarea directă, aglutinarea indirectă, inhibarea aglutinării, aglutinarea în coloană şi aglutinarea mediată de Ac anti-imunoglobuline. Ulterior vom discuta reacţiile de aglutinare utilizate în bacteriologie şi micologie.

Aglutinarea directă

Aglutinarea directă reprezintă aglutinarea Ag naturale ale unor particule (bacterii, celule) de către Ac specifici. Se poate utiliza în diagnosticul bacteriologic, de ex. pentru identificarea enterobacteriilor *(Shigella, Salmonella, E. coli* etc) pe baza structurii antigenice, în diagnosticul serologic al unor boli infecţioase (febră tifoidă, bruceloză etc), pentru determinarea grupelor sanguine (ABO) etc.

Aglutinarea indirectă sau pasivă

Este o reacţie în care particule artificiale (globule roşii formolate, particule de latex, cristale de colesterol, colodiu etc) sau naturale sunt „încărcate" in vitro cu Ag sau Ac şi sunt aglutinate de către Ac sau Ag corespondente din proba de cercetat. Se utilizează în principal pentru decelarea factorului reumatoid, determinarea CRP, determinarea grupului streptococic etc.

Inhibarea aglutinării

Reacţia constă în inhibarea aglutinării particulelor „încărcate" cu Ag, după ce în prealabil Ac reacţionează cu Ag corespondent. Se utilizează de ex. pentru decelarea mioglobinei sau în diagnosticul imunologic al sarcinii.

Aglutinarea în coloană

Metoda permite o mai bună vizualizare a reacţiei. Dispozitivul utilizat are 2 compartimente, partea în care se introduc reactivii (situată superior) şi o coloană situată inferior, plină cu microparticule de sticlă. După introducerea hematiilor şi a serului de cercetat şi „incubarea" acestora, dispozitivul este centrifugat. În cazul unei reacţii pozitive complexul Ag-Ac se va putea vizualiza la nivelul coloanei, în timp ce în cazul unei reacţii negative, hematiile se depun în porţiunea inferioară a coloanei.

Aglutinarea mediată de Ac anti-imunoglobuline

Anticorpii anti-Ig se vor cupla cu particule „încărcate" cu Ac şi vor duce la apariţia unor aglutinate (prin apariţia complexului imun). Se utilizează spre exemplu în decelarea factorului reumatoid (tehnica Waaler-Rose).

Utilizarea reacţiei de aglutinare în microbiologie

Vom prezenta atât exemple de utilizare a reacţiei de aglutinare în diagnosticul **direct** cât şi în diagnosticul **indirect** (serologic). Reamintim faptul că în cadrul diagnosticului de laborator serologic se va determina prezenţa (sau se va dovedi absenţa) Ac necunoscuţi în serul pacientului respectiv, utilizând Ag cunoscute. În diagnosticul serologic, de regulă, trebuie să putem răspunde la minim trei întrebări esenţiale: există anticorpi în serul pacientului investigat? care este titrul anticorpilor? cum evoluează în dinamică (în timp) acest titru? În acest scop vom realiza minim două determinări diferite la un interval de 7-10 zile (pentru majoritatea infecţiilor care pot fi diagnosticate astfel). În acest capitol vom discuta atât reacţii serologice calitative cât şi reacţii serologice cantitative.

Reacţii de aglutinare utilizate în diagnosticul de laborator microbiologic direct

Tehnica de aglutinare se execută în a patra etapă a diagnosticului de laborator, respectiv în etapa de identificare, pe baza caracerelor antigenice. În momentul aplicării acestei reacţii avem o serie de date pornind de la informaţiile clinice, paraclinice, epidemiologice, s-a prelevat un anumit p.p. care s-a examinat din punct de vedere microscopic şi a fost cultivat. Aşa cum am menţionat anterior, în vederea identificării este necesar să avem colonii izolate, cultură pură.

1. Aglutinarea pe lamă

Spre exemplu, în cursul identificării unei tulpini enterobacteriene *(Shigella spp., Salmonella spp., E. coli* etc), după cultivarea p.p. pe medii selectivo-diferenţiale se obţin colonii izolate şi din porţiunea superioară (bombată) a coloniilor izolate facem treceri pe medii multitest (ex. TSI, MIU). În ziua următoare, avem deja mai multe elemente pentru încadrarea tulpinii izolate într-o specie, dar, folosind spre exemplu cultura bacteriană dezvoltată pe mediul TSI, putem face reacţia de aglutinare. În nici un caz nu se vor utiliza pentru identificarea pe bază de caractere antigenice tulpini mai „vechi" de 18-24 ore.

Pentru realizarea reacţiei de aglutinare sunt necesare următoarele: cultura de identificat (colonii de tip S, de 18-24 ore), soluţie salină fiziologică, Ac cunoscuţi faţă de Ag pe care dorim să le identificăm (Ac polivalenţi, Ac monovalenţi de grup, Ac monovalenţi de tip, după caz), lame de microscop curate, pahar Berzelius cu amestec dezinfectant etc.

Iniţial, pe o lamă de microscop curată şi degresată punem la una dintre extremităţile lamei o picătură de soluţie salină fiziologică, în care suspendăm un fragment din colonia de identificat în aşa fel încât să obţinem o suspensie omogenă, opalescentă. În cazul în care suspensia rămâne omogenă, putem trece la etapele următoare; în cazul în care picătura „se limpezeşte" şi apar grunji, tulpina este ne-tipabilă prin această metodă (apare „aglutinarea nespecifică"), ar putea fi vorba de o tulpină care provine dintr-o colonie de tip R. În următoarea etapă, la cealaltă extremitate a lamei, punem o picătură de ser cu Ac cunoscuţi, de ex. polivalenţi şi realizăm o suspensie omogenă, opalescentă, a coloniei de identificat. Înclinăm

lama de câteva ori, uşor, în toate direcţiile, pentru a favoriza contactul dintre cei 2 reactanţi şi unirea complexelor Ag-Ac mici, solubile, pentru a forma reţele de complexe Ag-Ac. În cazul reacţiei pozitive (corespondenţă între Ac cunoscuţi şi Ag pe care dorim să îl identificăm) picătura „se limpezeşte" şi apar grunji de aglutinare. Este indicat să citim reacţia pe fond negru. De cele mai multe ori citirea se face cu ochiul liber însă în cazul unor aglutinate de dimensiuni foarte mici poate fi necesar să folosim o lupă, un microscop sau un aglutinoscop. Pentru identificarea diferitelor microorganisme există scheme care orientează etapele de urmat (tabelele şi schemele respective se livrează de către producători împreună cu serurile cu Ac specifici). Lamele pe care se fac reacţiile de aglutinare, după terminarea reacţiilor se introduc în amestecul dezinfectant.

În cadrul lucrărilor practice vor fi discutate aglutinările pentru identificarea *E. coli, Salmonella spp.* până la nivel de specie (conform clasificării Kauffmann-White) şi respectiv a grupurilor de *Shigella spp.* Tot prin aglutinare directă se mai pot identifica tulpini de *Vibrio cholerae, Haemophilus influenzae* tip b, tulpini de *Brucella spp.*, tulpini de *E. coli* entero-patogen, iar în cazul leptospirelor şi unor rickettsii apariţia aglutinării trebuie verificată cu ajutorul microscopului.

Reacţii de aglutinare indirectă se pot utiliza pentru detectarea în p.p. a streptococilor de grup A sau B, pneumococilor, meningococilor, *E. coli* tip capsular K1, *H. influenzae* tip capsular b, pentru detectarea unor enterotoxine (stafilococice, clostridiene etc), pentru detectarea unor fungi *(Cryptococcus neoformans, Candida albicans, Aspergillus spp.)* sau a unor virusuri. Tot prin tehnica de aglutinare indirectă se pot identifica exotoxine în filtratul de cultură, streptococii de grup A-D, *E. coli* O:157, *Legionella pneumophila, Listeria monocytogenes* etc.

2. Aglutinarea în tuburi

Tehnica de aglutinare în tuburi se poate folosi pentru confirmarea unui rezultat pozitiv la aglutinarea pe lamă sau atunci când rezultatul unei aglutinări pe lamă nu este suficient de clar. Vom avea la dispoziţie cultura pură de identificat care se va prepara diferenţiat în funcţie de tipul de Ag pe care dorim să-l identificăm. Spre exemplu, dacă încercăm să identificăm Ag de tip O, iar bacteria ar putea să prezinte şi Ag H sau Ag K (care ar putea inhiba aglutinarea cu Ag O) cultura se va menţine 1-2 ore la 100°C pentru inactivarea Ag de înveliş, după care se va trece la realizarea aglutinării în tuburi (o procedură asemănătoare poate fi necesară şi în cazul tehnicii de aglutinare pe lamă). Vom utiliza un şir de eprubete în care vom introduce Ac cunoscuţi, care se vor dilua succesiv, binar, cu soluţie salină fiziologică. În tuburile respective vom adăuga o cantitate echivalentă de suspensie Ag (spre ex., la 0,5 ml Ac vom adăuga 0,5 ml suspensie Ag). Incubarea se va face diferenţiat, în funcţie de tipul de Ag pe care dorim să-l identificăm (ex. 20 ore la 52°C pentru identificarea Ag O).

Reacţia este pozitivă în cazul apariţiei aglutinatelor (grunjoase - în cazul prezenţei Ag O, floconoase – în cazul prezenţei Ag H etc). Reacţia de aglutinare în tuburi permite şi verificare titrului la care are loc formarea complexelor Ag-Ac.

Reacţii de aglutinare utilizate în diagnosticul serologic

În diagnosticul serologic, în mod obişnuit, reacţiile utilizate permit detectarea prezenţei Ac în serul de cercetat dar şi stabilirea titrului. Totuşi există şi câteva exemple de reacţii de aglutinare calitative.

1. Aglutinarea pe lamă

Reacţiile de aglutinare pe lamă Huddleson (în diagnosticul brucelozei) şi respectiv Kudicks-Steuer (în diagnosticul tifosului exantematic) au intrat în istoria medicinei. Prima dintre reacţii o utilizăm demonstrativ în cadrul lucrărilor practice, apariţia aglutinatelor fiind clară iar tehnica de lucru foarte simplă. Sunt necesare următoarele materiale: lame de microscop curate, Ag brucelos inactivat (colorat în violet), ser de cercetat. Pe o lamă de microscop depunem o picătură din soluţia de Ag brucelos şi în imediata vecinătate a acesteia, o picătură de ser de cercetat. Cu colţul unei alte lame amestecăm şi omogenizăm cei doi reactanţi. Prin mişcări de înclinare a lamei în toate direcţiile facilităm formarea complexelor Ag-Ac, în cazul în care în serul de pacient sunt prezenţi Ac anti-*Brucella spp.* Reacţia este pozitivă în cazul în care se remarcă prezenţa aglutinatelor. Chiar şi în perioada în care această se utiliza în diagnostic, o reacţie pozitivă pe lamă trebuia să fie confirmată prin aglutinare în tuburi.

Tehnica de aglutinare indirectă poate fi utilizată în diagnosticul serologic al infecţiilor produse de *Helicobacter pylori, Treponema pallidum* (hemaglutinare pasivă) etc.

2. Aglutinarea în tuburi

Tehnica de aglutinare în tuburi se poate folosi în diagnosticul serologic al brucelozei (reacţia Wright), diagnosticul serologic al infecţiilor produse de *Cryptococcus neoformans,* diagnosticul serologic al febrei tifoide etc. Denumirea de reacţie Widal pentru diagnosticul serologic al febrei tifoide a intrat în istoria medicinei.

Luând în discuţie diagnosticul serologic al febrelor enterice, inclusiv febra tifoidă, sunt necesare următoarele: seruri recoltate (în dinamică) de la pacienţii la care se suspicionează acest diagnostic, tampon fosfat salin, baie de apă cu temperatură reglabilă, Ag cunoscute (Ag O şi Ag H). Se va lucra cu minim două rânduri de eprubete, un rând pentru detectarea prezenţei şi titrului Ac anti-O, al doilea pentru detectarea prezenţei şi titrului Ac anti-H (pentru persoanele în convalescenţă sau în cazul suspicionării stării de purtător vom încerca să identificăm în serul de cercetat Ac şi titrul Ac anti-Vi, de ex. prin hemaglutinare pasivă).

Serul de cercetat, pentru fiecare rând de tuburi, va fi diluat cu tampon fosfat salin, în diluţii binare. Dacă amestecul de ser de cercetat şi diluant va fi în cantitate de 0,5 ml, vom adăuga o cantitate similară de Ag, câte 0,5 ml Ag O în primul rând de tuburi şi respectiv câte 0,5 ml Ag H în al doilea rând de tuburi. Vom proceda în aşa fel încât să obţinem în primul tub o diluţie de 1/20, în al doilea tub 1/40 etc. Un tub va conţine doar un amestec de tampon fosfat salin şi soluţie Ag (tub martor). După ce omogenizăm conţinutul tuburilor, vom incuba tuburile cu Ag O timp de 20 ore la 52°C, iar tuburile cu Ag H vor fi incubate timp de 2 ore la 52°C urmat de 10 minute la temperatura camerei.

Citirea se va realiza după incubare, comparând rezultatul din fiecare tub cu martorul pentru Ag. Pentru evidenţierea reacţiei vom agita uşor tuburile. Aglutinarea H diferă de aglutinarea O. Aglutinatul O este mai dens, mai grunjos, în timp ce aglutinatul H este mai floconos şi uşor de disociat prin agitare. Ultimul tub care mai prezintă aglutinare vizibilă permite stabilirea titrului reacţiei. În capitolul 31 vom relua acest tip de diagnostic şi vom discuta modalităţile de interpretare.

18. REACȚIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI

Sistemul complement

Complementul reprezintă un constituent foarte important al apărării naturale şi respectiv o componentă normală a serului. Sistemul complement (C') cuprinde circa 30 de componente celulare sau plasmatice. Sistemul C' se poate activa pe trei căi, repectiv calea clasică, calea lectinică şi calea alternă. Activarea pe calea clasică este declanşată în primul rând de formarea complexelor imune (Ag-Ac) dar şi de apariţia celulelor apoptotice, anumite virusuri sau de proteina C reactivă cuplată cu anumiţi liganzi. Calea lectinică poate fi activată de microorganisme care prezintă în structură grupuri manoză-terminale. Calea alternă poate fi activată de bacterii, fungi, virusuri sau de celule tumorale etc.

Sistemul C' prezintă numeroase activităţi biologice fiind implicat în inflamaţie (componentele C3a, C4a, C2b, C5a, complexul C5b7, C3e), în apărarea anti-infecţioasă (opsonizare, facilitarea fagocitozei, liza microorganismului implicat), în metabolismul complexelor imune, clearance-ul celulelor apoptotice sau în reglarea răspunsului imun. Cu toate că în mod obişnuit are un rol benefic, sistemul C' poate avea şi efecte dăunătoare.

Reacția de fixare a complementului (RFC)

Face parte dintre reacţiile al căror rezultat nu poate fi vizualizat fără un artificiu tehnic, în acest caz utilizarea unui sistem hemolitic indicator. Motivul pentru care este necesar acest sistem indicator se datorează faptului că Ag este fie sub formă macromoleculară fie este reprezentat de corpi microbieni de dimensiuni foarte mici, iar complexul Ag-Ac format nu devine vizibil cu ochiul liber. RFC a fost imaginată încă din anul 1901 de către Jules Bordet şi s-a perfecţionat destul de mult de-a lungul timpului. Această reacţie este utilizată în peste 100 de sisteme Ag-Ac, prin tehnici clasice sau tehnici care au suferit modificări, inclusiv introducerea micrometodelor RFC.

Reacţia de fixare a complementului se poate folosi atât pentru identificarea Ag cât şi în diagnosticul serologic. Pentru că nu urmează să discutăm pe larg prima variantă, vom enumera doar câteva dintre exemple, RFC permiţând identificarea unor Ag rickettsiene, chlamydiene, virale etc. În diagnosticul serologic, cea mai cunoscută metodă rămâne încă RFC Bordet-Wasserman, utilizată în diagnosticul serologic al sifilisului.

Subliniem faptul că RFC este o metodă laborioasă, în care nu se admit erori tehnice, dar fiind executată corect este foarte exactă, are o mare sensibilitate şi specificitate. Este de asemenea una dintre metodele cu un mare grad de reproductibilitate.

Principiu

RFC se bazează pe proprietatea sistemului C' de a se fixa pe complexul imun Ag-Ac. În prima fază a reacţiei se introduce serul de cercetat iar dacă acest ser conţine Ac specifici faţă

de Ag cunoscut se va forma un complex Ag-Ac, urmat de fixarea C', care se va activa pe calea clasică şi nu va mai fi „disponibil" pentru a se fixa pe sistemul hemolitic indicator (hematii + Ac-antihematie). În cazul în care serul de cercetat nu conţine Ac specifici faţă de Ag cunoscut, nu va avea loc formarea unui complex Ag-Ac în prima etapă a RFC. După introducerea în reacţie a sistemului hemolitic indicator, hematiile şi Ac-antihematie se vor cupla, vor forma un complex imun, iar C' „liber" se va fixa pe acesta. După fixare va urma activarea C' şi respectiv liza hematiilor, hemoliza putând fi examinată cu ochiul liber.

Materiale şi reactivi necesari

- serul de cercetat recoltat de la pacientul suspect sau o pereche de seruri, obţinute „în dinamică";
- seruri de referinţă (martor pozitiv şi negativ);
- Ag cunoscut (suspensie corpusculară sau soluţie coloidală, după caz);
- sistemul C' obţinut din ser proaspăt sau conservat recoltat de la cobai;
- sistemul hemolitic indicator format din
  - hematii de berbec, soluţie 4%, valabil timp de o săptămână la 4°C
  - ser hemolitic anti-hematii de berbec (obţinut prin injectări repetate de hematii de oaie la iepurele de laborator, spălate cu soluţie salină fiziologică) titrat şi conservat la 4°C
- baie de apă cu temperatură reglabilă
- plăci cu godeuri, tuburi de hemoliză, pipete diferite etc.

Tehnica de lucru

Aşa cum am menţionat, tehnica de lucru este laborioasă şi nu va fi prezentată în totalitate, în cele ce urmează.

- serul de cercetat se va menţine 30 minute la 56°C, în baia de apă, pentru inactivarea C' propriu;
- principial, RFC are loc în 2 etape;
  - în prima etapă se pun în reacţie C', serul de cercetat şi Ag cunoscut; sunt 2 posibilităţi: a. în serul de cercetat **există Ac specifici,** rezultând un complex Ag-Ac pe care se va fixa C' b. în serul de cercetat **nu există Ac specifici,** nu se formează complex Ag-Ac, C' rămâne liber
  - în a doua etapă se introduce în reacţie sistemul hemolitic indicator (hematii + Ac antihematie); există 2 posibilităţi: a. C' nu este liber, nu are loc hemoliza, b. C' se fixează pe sistemul hemolitic, lizează hematiile şi observăm apariţia hemolizei
- toţi reactivii utilizaţi trebuie standardizaţi, respectiv se vor realiza
  - omogenizarea suspensiei de hematii cu eventuală etalonare prin spectrofotometrie
  - titrarea serului hemolitic
  - titrarea C' în prezenţa Ag
  - titrarea bidimensională a Ag şi a serului de referinţă

- în RFC finală se va proceda astfel
  - se diluează conform indicaţiilor din protocolul de lucru reactivii utilizaţi (serul hemolitic, serurile de cercetat, Ag, serurile de referinţă, C')
  - se repartizează în godeurile corespunzătoare serurile de cercetat, Ag şi C'
  - pe o placă separată se prepară martorii (martor pentru sistemul hemolitic, martor pentru C', martor pentru Ag, 2 martori pentru serul de referinţă, martor sigur negativ)
  - plăcile se introduc până a doua zi la 4°C
  - a doua zi, plăcile se menţin la 37°C timp de 30 minute
  - se adaugă în toate godeurile sistem hemolitic
  - plăcile se menţin la 37°C timp de 30 minute
  - se pun plăcile la 4°C, până la sedimentarea hematiilor
  - există anumite diferenţe între tehnicile cantitative şi cele calitative, dar principiile sunt aceleaşi
  - în RFC Bordet-Wasserman, metodă calitativă, reacţia se realizează în eprubete, 2 pentru reacţia propriuzisă (una cu ser diluat 1/8, celaltă cu ser diluat 1/16, 2 pentru martori sigur pozitiv şi sigur negativ şi câte una pentru fiecare din ceilalţi martori, respectiv martor pentru serul de cercetat, martor pentru Ag, martor pentru C', martor pentru serul hemolitic)

Interpretare

Iniţial se verifică rezultatele apărute pentru martori (fie că este vorba de o metodă cantitativă sau calitativă); spre ex. în cazul metodei calitative, în tubul martor pentru serul de cercetat trebuie să fie hemoliză, la fel ca şi în tuburile martor pentru Ag, C şi ser sigur negativ. În tuburile martor sigur pozitiv şi martor pentru sistemul hemolitic, nu trebuie să fie hemoliză.

În tuburile cu serul de cercetat, dacă apare hemoliza, înseamnă că **nu există Ac,** iar testul este **negativ** (lichidul din tub va avea un aspect roşu, limpede).

Testul este **pozitiv** atunci când în tuburile cu ser de cercetat nu apare hemoliză, hematiile se depun formând un „buton" în partea inferioară a tubului (în serul de cercetat **există Ac**). Pentru a stabili diagnosticul final, este necesar ca RFC-BW să fie confirmată prin reacţii specifice (vezi capitolul 45).

Control de calitate

Cu privire la controlul de calitate am menţionat utilizarea martorilor, pentru fiecare reacţie.

În RFC utilizată în diagnosticul serologic, Ag cunoscut va fi ales în funcţie de suspiciunea de diagnostic. RFC cantitativă se poate utiliza pentru diagnosticul serologic al infecţiilor produse de *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia spp., Rickettsia spp., Treponema pallidum, Leptospira spp., Borrelia spp., Brucella spp.,* diferite virusuri etc.

În scopul creşterii sensibilităţii şi specificităţii se aleg proprietăţile Ag cunoscut, o anumită temperatură „de incubare" (de ex. 4°C în loc de 37°C în RFC Kolmer) etc. Ac fixatori de C' apar precoce în cursul bolii astfel încât identificarea prezenţei lor poate semnifica o infecţie acută sau recentă

19. REACȚIA DE NEUTRALIZARE (SERONEUTRALIZARE)

La fel ca şi RFC, în reacţia de seroneutralizare (RSN) este necesar un artificiu tehnic pentru a permite vizualizarea rezultatelor. În cazul RSN, Ag are o anumită proprietate biologică (toxică, enzimatică) care poate fi blocată prin cuplarea cu Ac specific. Neutralizarea efectului biologic respectiv se poate realiza doar în cazul în care determinantul pentru toxicitate sau pentru activitatea enzimatică respectivă este acelaşi cu determinantul antigenic (epitop).

Reacţiile de seroneutralizare ar putea fi utilizate în mai multe împrejurări, spre exemplu în:

- diagnosticul microbiologic direct
  - identificarea *Clostridium perfringens* prin metoda plăcilor semineutralizate (vezi cap. 44)
  - testarea toxigenezei unei tulpini de *Corynebacterium diphteriae* (test de seroprotecţie, vezi cap. 11)
  - toxinotipia în cazul suspicionării unei toxi-infecţii alimentare cu *Clostridium botulinum* (vezi cap. 11 şi 45)
- diagnosticul serologic
  - reacţia ASLO (vezi şi cap. 25)
- prevenirea unor boli infecţioase prevenibile prin vaccinare şi evaluarea eficacităţii vaccinale
  - vaccinarea cu anatoxine (DTP, DT, ATPA, ADPA; vezi şi cap. 22)
  - titrarea prezenţei Ac anti-toxine (difterică, tetanică etc)
  - testarea prin IDR (intra-dermo-reacţie) a susceptibilităţii faţă de o anumită boală infecţioasă care are la bază drept mecanism patogenic efectul unei exotoxine
- tratamentul/profilaxia unor boli infecţioase prin utilizarea de imunoglobuline specifice omologe sau utilizarea unor seruri hiperimune heterologe.

Reacţia ASLO

Această reacţie poate fi utilizată în diagnosticul retrospectiv al unei infecţii streptococice sau pentru confirmarea etiologiei unei boli poststreptococice (împreună cu criteriile minore şi majore de diagnostic). Reacţia ASLO determină titrul Ac anti streptolizină O (SLO).

Principiu

Titrarea Ac anti-SLO se bazează pe faptul că SLO are efect hemolitic asupra hematiilor de iepure sau de berbec. În cazul în care în serul de cercetat există Ac anti-SLO, acţiunea hemolitică a SLO este neutralizată. Combinând diluţii din serul de cercetat cu o cantitate constantă de SLO vom putea determina titrul ASLO.

Materiale şi reactivi necesari

- ser de cercetat (sau seruri „pereche", recoltate la interval de 2 săptămâni);
- SLO liofilizată (standardizată de către producător);
- sânge defibrinat de iepure/berbec;
- soluţie salină izotonă, soluţie de rivanol 0,3%;
- eprubete, pipete gradate foarte curate;
- baie de apă, centrifugă etc.

Tehnica de lucru

Trebuie urmate toate indicaţiile din protocolul de lucru, respectiv

- se omogenizează suspensia de hematii;
- se îndepărtează inhitorii SLO din serul de cercetat (utilizăm soluţie de rivanol şi suspensie de cărbune activ, realizăm o diluţie de 1/10 a serului care se va menţine 30 minute la 56°C);
- se realizează diluţiile de ser şi se repartizează în tuburile de reacţie (ser în diluţii succesive) împreună cu SLO (în cantitate constantă, câte 0,5 ml/tub); combinarea serului de cercetat cu SLO reprezintă prima etapă a reacţiei;
- se agită tuburile pentru omogenizare şi se menţin timp de 15 minute la 37°C;
- urmează a doua etapă a reacţiei ASLO, respectiv adăugarea suspensie de hematii (5%), câte 0,5 ml în fiecare tub;
- se agită pentru omogenizare şi se incubează timp de 45 minute la 37°C;
- se centrifughează tuburile timp de 1 minut (1.500 rotaţii/minut) şi se menţin până a doua zi la 4°C (temperatura frigiderului).

Interpretare

Pornind de la o diluţie iniţială a serului de 1/10, după adăugarea tuturor reactivilor titrul (numărul de unităţi ASLO) va fi 12, 50 în tubul următor, 100, 125, 166, 250, 333 etc în tuburile următoare. Titrul reacţiei ASLO este dat de cea mai mare diluţie de ser la care lipseşte complet hemoliza. Pentru zona noastră geografică se acceptă ca normal un titru de 200 (maxim 250) unităţi ASLO. Există teste serologice şi pentru evidenţierea prezenţei şi titrului anticorpilor faţă de alte structuri antigenice (de exemplu streptodornază, hialuronidază, streptokinază).

Control de calitate

Ultimele două tuburi sunt reprezentate de tubul martor pentru hematii, în care se verifică rezistenţa hematiilor şi respectiv tubul martor pentru SLO în care se pun SLO şi suspensia de hematii.

Există şi posibilitatea de a realiza o micrometodă ASLO în plăci de material plastic cu godeuri, însă metoda clasică rămâne metoda de referinţă.

Utilizarea RSN în profilaxia şi tratamentul unor boli infecţioase

Vaccinarea în scopul obţinerii unei protecţii prin seroneutralizare

Vaccinul DTP include o suspensie de germeni *(Bordetella pertussis)* în faza I, combinată cu anatoxina difterică şi tetanică. Primovaccinarea se începe vârsta de 2 luni a nou-născutului,

administrându-se 3 doze la interval de 2 luni (la 2, 4, 6 luni). Pentru menţinerea imunităţii se practică revaccinarea I la 6 luni de la primo-vaccinare, iar revaccinarea a II-a se practică la 36 de luni de viaţă a copilului respectiv. Datorită posibilelor reacţii adverse (faţă de componenta pertussis) se recomandă eliminarea acesteia la nou-născuţii cu probleme ale sistemului nervos, la cei predispuşi la boală şi la cei care au avut o reacţie adversă semnificativă la o administrare anterioară a DTP-ului. Se studiază posibilitatea utilizării pe scară largă a unui vaccin acelular în care să fie inclusă toxina pertussis inactivată.

Evaluarea eficacităţii vaccinurilor

- Se recomandă testarea stării de imunitate indusă prin vaccinare, conform normativelor elaborate de autorităţile de sănătate publică; metodele au la bază titrarea Ac anti-toxină (difterică, tetanică etc) în seruri prelevate de la copii vaccinaţi, prin diferite tehnici. Spre exemplu se consideră că un copil este protejat (prezintă rezistenţă specifică în cazul unei infecţii difterice) dacă titrul Ac-anti toxină difterică este mai mare de 0,03 UAI/ml
- Se pot face teste de susceptibilitate, in vivo, pentru a verifica dacă persoana investigată este sau nu protejată faţă de o eventuală infecţie. În acest scop se practică IDR. În istoria medicinei au intrat IDR Dick, care permite testarea susceptibilităţii faţă de scarlatină (toxina este elaborată de către streptococul de grup A lizogenizat) şi respectiv IDR Schick, care permite testarea susceptibilităţii faţă de difterie (toxina este elaborată de către bacilul difteric lizogenizat).
  - ambele IDR se realizează similar din punct de vedere tehnic
  - spre ex. în cazul IDR Schick se injectează în treimea medie a antebraţului, strict intradermic o cantitate de 0,1 ml toxină difterică diluată corespunzător. În cazul în care în sângele persoanei testate se găseşte o cantitate de Ac anti-toxină mai mare de 0,03 UAI / ml, toxina inoculată va fi neutralizată şi nu va apărea nici o modificare la locul inoculării (lipsa eritemului semnifică faptul că persoana testată nu este susceptibilă să facă difterie, în cazul în care se infectează cu un bacil difteric toxigen). În cazul în care persoana respectivă nu prezintă Ac anti-toxină difterică, Ag inoculat va conduce la apariţia unui eritem la locul de inoculare
  - UAI = unitate anti-toxică internaţională

Terapia sau profilaxia specifică (imunoterapie pasivă)

- Administrarea de imunoglobuline specifice omologe, obţinute de la persoane imunizate (natural sau artificial) faţă de o anumită maladie infecţioasă, de ex. în imunoterapia infecţiei cu *Clostridium tetani* (tetanos) se pot administra intramuscular 3-6.000 UAI
- Administrarea de seruri imune heterologe, obţinute prin hiperimunizarea căilor, în tratamentul tetanosului, difteriei, botulismului etc.

Terapia bolilor în care mecanismul patogenic implică exotoxine trebuie instituită cât mai rapid, deoarece exotoxinele pot fi neutralizate numai atunci când se găsesc în circulaţie.

20. REACȚII ÎN CARE COMPONENTELE SUNT MARCATE

Reamintim că, în funcţie de natura antigenului, metodele aplicate pentru vizualizare, scopul urmărit există mai multe tipuri de reacţii Ag-Ac, şi anume:

1. reacţii de precipitare;
2. reacţii de aglutinare;
3. reacţia de fixare a complementului (RFC);
4. reacţii de seroneutralizare.

Dacă în cazul primelor 2 tipuri de reacţii vizualizarea se poate face direct (cu ochiul liber, cu ajutorul unei lupe etc) în cazul RFC şi RSN este necesară utilizarea unor „sisteme indicator". În continuare vom discuta despre reacţiile Ag-Ac în care pentru interpretare este necesară marcarea reactanţilor, ceea ce se poate face:

- izotopic (radio immuno assay, RIA);
- enzimatic (enyzme linked immuno assay, ELISA);
- fluorescent (fluorescent immunoassay, FIA);
- chemiluminiscent (chemiluminiscent assay, CLA) etc.

Radioimunoanaliza (RIA)

Posibilitatea utilizării izotopilor radioactivi în medicină a condus la multe descoperiri importante în domeniu. Introducerea RIA, pentru determinarea cantitativă a prezenţei unui mare număr de substanţe prezente în cantităţi foarte mici în lichidele biologice, a constituit un real succes. RIA a fost şi încă mai este utilizată în multe dintre specialităţile medicale.

Pentru marcarea Ag se pot utiliza ^{3}H, ^{125}I, ^{14}C etc. Se introduc în reacţie o cantitate cunoscută de Ag marcat radioactiv, Ag nemarcat pe care dorim să îl dozăm şi Ac cunoscuţi cu specificitate faţă de Ag. Se va realiza o competiţie pentru cuplarea cu Ac între Ag marcat şi Ag nemarcat radioactiv. După respectarea timpilor din protocolul de lucru se măsoară radioactivitatea complexului Ag-Ac şi aplicând formule de calcul corespunzătoare se poate afla cantitatea de Ag nemarcat.

RIA este o tehnică obiectivă, cu foarte mare sensibilitate, permite cuantificarea unor cantităţi foarte mici de Ag sau de haptene dar, datorită problemelor legislative, costului aparaturii şi reactivilor, riscurilor implicate, este înlocuită din ce în ce mai mult cu tehnici de tip ELISA.

Analiza imunoenzimatică (ELISA, EIA)

Marcarea enzimatică a fost introdusă pentru prima oară în histochimie, în 1966, după 5 ani devenind un marker şi în cazul reacţiilor Ag-Ac. Prezenţa complexelor Ag-Ac va putea

fi vizualizată şi cuantificată deoarece unul dintre reactivi este conjugat cu o enzimă, iar după adăugarea în mediul de reacţie a unui substrat cromogen specific enzimei marker, densitatea optică a mediului de reacţie se va modifica iar valoarea densităţii optice se poate înregistra.

Reacţiile imunoenzimatice pot avea lor în sistem omogen sau heterogen (activitatea markerului enzimatic nu este influenţată de către reacţia Ag-Ac). În continuare nu vom discuta decât despre al doilea „tip" de reacţii, care sunt mai frecvent utilizate în microbiologie.

Tehnicile ELISA pot fi utilizate atât pentru identificarea Ag cât şi pentru identificarea şi/sau titrarea Ac. În general, reacţiile imunoenzimatice se realizează în următoarea succesiune:

- primul reactiv (Ag sau Ac, în funcţie de ceea dorim să determinăm) este „fixat" pe un suport solid (foarte frecvent reprezentat de godeurile unor plăci de plastic, dar pot fi şi bile, tuburi etc); de regulă această fixare se realizează de către companiile producătoare;
- adăugăm al doilea reactiv, cel necunoscut (Ac sau Ag);
- în cazul în care există complementaritate structurală şi electrochimică între cei doi reactivi, are loc cuplarea şi formarea complexului Ag-Ac; pentru eliminarea reactivilor care nu au intrat în complex are loc o primă spălare;
- reactivul adăugat în următoarea etapă variază în funcţie de tipul de tehnică ELISA (în finalul acestui subcapitol vom prezenta pentru exemplificare una dintre variantele tehnice); de ex. se poate adăuga un reactiv care se poate cupla cu Ac, iar acest reactiv este la rândul lui cuplat cu enzima (conjugat enzimatic); în continuare are loc o nouă spălare;
- pentru vizualizarea reacţiei, adăugăm un substrat cromogen pe care enzima poate acţiona şi conduce la apariţia unei culori care se poate vedea şi cu ochiul liber, dar se citeşte cu ajutorului unui spectrofotometru;
- valorile înregistrate pentru „probă" se compară cu valorile înregistrate pentru martorul pozitiv şi martorul negativ, se aplică formula indicată de către producător, iar interpretarea se face aşa cum este indicat în protocolul tehnic care însoţeşte trusa ELISA.

Enzimele utilizate mai frecvent sunt fosfataza alcalină şi peroxidaza. În cazul primei enzime, substratul cromogen va fi p-nitro-fenil-fosfatul, iar în cazul peroxidazei, substratul cromogen va fi o-fenilen-diamina în soluţie de apă oxigenată.

Prin tehnicile de tip ELISA se obţine o specificitate bună sau foarte bună, iar sensibilitatea este comparabilă cu cea obţinută în cazul RIA. Tehnica este obiectivă, a devenit automatizată, iar prin extinderea ofertei şi creşterea numărului celor care o utilizează preţurile sunt competitive.

Există mai multe modalităţi de clasificare pentru aceste tehnici, spre exemplu:

- în funcţie de scopul urmărit, se poate determina prezenţa Ag în diferite produse patologice sau prezenţa Ac în ser, LCR, alte umori;
- în funcţie de tipul şi ordinea reactivilor introduşi în reacţie tehnicile pot fi necompetitive sau de competiţie (directe sau indirecte);
- în funcţie de complexitatea tehnicii, putem discuta despre variantele clasice (aşa cum a fost descris mai sus şi respectiv aşa cum urmează să fie prezentat în exemplul concret) şi respectiv despre variantele simple/rapide.

În anumite situaţii, rezultatele obţinute prin ELISA trebuie confirmate prin metode mai specifice.

În continuare vom prezenta succint etapele ELISA în cazul determinării prezenţei de Ac anti-mycobacterieni în ser. Nu există încă o standardizare a diagnosticului serologic în tuberculoză (vezi cap. 42) dar aşa cum urmează să discutăm, pentru a pune diagnosticul unei infecţii cu *M. tuberculosis*, toate datele care pot fi obţinute sunt importante şi trebuie analizate în context.

Principiu

Anticorpii prezenţi în serul de analizat se leagă specific de Ag imobilizate pe microplăci Koh-I-Nor Hardmuth. Complexul imun format, reacţionează prin fragmentul Fc al imunoglobulinelor (în special IgG) cu conjugatul Proteină A stafilococică - peroxidaza din hrean (SpA-HRPO) care este pus în evidenţa cu orto-fenilen-diamină HC1 (OPD). Reacţia este cuantificată fotometric.

Materiale şi reactivi necesari

- Plăci sensibilizate (IC)
- Tampon 1 (TFSTCH) este format din tampon fosfat salin pH 7,2, 0,15M, Tween 20 0,05% caseină Hammersten 0,5% şi mertiolat de sodiu 0,1%. Se păstrează la + 4°C. Este utilizat pentru rehidratare şi diluări.
- Tampon 2 (TFST) de 10 ori concentrat are aceeaşi compoziţie ca Tamponul 1 cu excepţia caseinei Hammersten. este utilizat pentru spălări.
- Tampon citrat (3) pH 5,0, pentru dizolvarea OPD
- Ortofenilen diamină (pastile de 9mg, cântărite de producător)
- Ser de cercetat
- Ser martor pozitiv (M+)
- Ser martor negativ (M-);
- Soluţie concentrată de conjugat SpA-HRPO;
- Perhidrol (30% H_2O_2).

Tehnica de lucru

- În godeurile plăcii sensibilizate (Institutul Cantacuzino) se introduc 100 µl Tampon 1 şi se incubează 60 minute la 37°C.
- Placa se goleşte de conţinut (automat sau prin răsturnare şi scuturare pe un strat de hârtie de filtru).
- Probele de ser de analizat şi serurile martor (M+ şi M-) se diluează 1/25 în Tampon 1 (25 µl ser + 0.6 ml Tampon 1). Serurile se repartizează câte 100 µl în 3 godeuri paralele, notându-se în caietul de lucru poziţia serurilor.
- Incubăm placa la 37°C timp de 60 min, în atmosfera umedă.
- Placa se spală de 3 ori cu Tampon 2 şi de 2 ori cu apă distilată, pentru înlăturarea spumei. Pentru această operaţie, întâi se diluează Tamponul 2 concentrat prin amestecarea unui volum Tampon 2 cu 9 volume apă distilată.

- Conjugatul SpA - HRPO se diluează 1/500 în Tampon 1 (30 µl conjugat + 15 ml Tampon 1) şi se repartizează câte 100 µl/godeu
- Se incubează 60 min la 37°C în cameră umedă.
- Se înlătură din godeuri conjugatul şi se spală ca mai sus de 3 ori cu Tampon 2 şi de 2 ori cu apă distilată.
- Se prepară soluţia de OPD prin adăugarea a 15 ml Tampon 3 şi 8 µl perhidrol, repartizându-se câte 100 µl/godeu.
- Se incubează la temperatura camerei, ferit de lumină directă, până în momentul apariţiei în godeul corespunzător serului M+ a unei culori galbene intense iar corespunzător serului M- lipsa apariţiei culorii. Aceasta se realizează în circa 10-30 min.
- Analiza se face cu ajutorul unui fotometru ($\lambda = 450$ nm) fără blocare cu acid.

Interpretare

- Rezultatele se exprimă în Unităţi Imuno Enzimatice (UIE) dupa relaţia: (OD X - OD M-/OD M+ - OD M -) × 100

* în care OD X reprezintă densitatea optică a probei de analizat, OD M- este densitatea optică a serului martor negativ, iar OD M+ densitatea optică a serului martor pozitiv.

- Valorile de pînă la 10 UIE sunt considerate nesemnificative, deşi pot indica un început de sinteză de anticorpi, repetarea determinării după 1-2 luni, putând indica o creştere a titrului.
- Indiferent de valoarea obţinută rezultatele se vor interpreta în contextul clinic, epidemiologic şi paraclinic, ţinând cont de rezultatele examenului microbiologic direct.

Imunofluorescenţa (FIA, IF)

Imunofluorescenţa poate fi utilizată atât în diagnosticul microbiologic direct (pe p.p. recoltat de la bolnav sau pe cultura pură) cât şi în diagnosticul serologic. Unul dintre reactivi (Ag, Ac sau Ac anti-Ac) este marcat fluorescent. Posibilitatea cuplării stabile a Ac cu fluorocromi, fără alterarea specificităţii Ac, a fost evidenţiată încă din anul 1942.

Fluorocromii sunt compuşi organici care, după „iradiere" cu radiaţii ultraviolete absorb radiaţia excitantă, intră în stare de excitaţie iar atunci când revin în „starea normală" pierd energia acumulată emiţând radiaţii luminoase (vezi şi cap. 8). Dintre fluorocromi am putea aminti auramina O, rhodamina B, acridin-oranj R sau tripaflavina. Lumina vizibilă emisă depinde de fluorocromul utilizat (spre exemplu culoarea este galbenă pentru auramina O, galben-portocalie pentru combinaţia de auramină O – rhodamină B etc).

Tehnicile IF pot fi de tip direct sau de tip indirect.

În cazul IF directă, Ag este necunoscut şi se poate afla într-o cultură, etalat pe frotiu ca atare sau „parazitând" anumite celule (ex. se poate utiliza o probă recoltată prin biopsie). Produsul care urmează a fi analizat este incubat în prezenţa Ac marcaţi fluorescent, cunoscuţi. Spre ex. în cazul frotiului „colorat" fluorescent, după realizarea frotiului acoperim lama cu serul care conţine Ac marcaţi fluorescent, incubăm timp de 30 minute la 37°C, spălăm cu tampon fosfat salin şi apoi cu apă distilată (pentru îndepărtarea Ac care nu au

intrat în complexul Ag-Ac), aşteptăm să se usuce şi examinăm cu microscopul cu fluorescenţă. Putem identifica astfel Ag aparţinând speciilor *Legionella pneumophila, Bordetella pertussis, Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia trachomatis, Treponema pallidum, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Pneumocystis jiroveci* etc. Metoda este rapidă şi aplicabilă pentru frotiuri din p.p. sau din cultură dar şi în anatomia patologică sau în histochimie. Pentru fiecare Ag de cercetat trebuie preparat serul care conţine Ac specifici, marcaţi fluorescent.

IF indirectă presupune realizarea unui frotiu pornind de la Ag cunoscut. Frotiul se acoperă cu ser de cercetat şi după o incubaţie de 30 minute la 37°C spălăm cu tampon fosfat salin şi cu apă distilată pentru îndepărtarea reactivilor care nu au intrat în reacţia Ag-Ac. Pe frotiu se pune un ser cu Ac anti-Ig de om, marcaţi fluorescent şi se incubează timp de 30 minute la 37°C, se spală, se aşteaptă uscarea frotiului, urmând examinarea la microscopul cu fluorescenţă. În situaţia în care în serul de cercetat există Ac specifici Ag cunoscut, are loc formarea complexului Ag-Ac, iar în etapa următoare, Ac anti-Ig de om se cuplează pe complex şi în mod indirect, prin fluorescenţă, identificăm (şi în unele variante tehnice putem titra) Ac. Metoda poate fi utilizată în diagnosticul serologic al infecţiilor produse de *Legionella pneumophila, Mycoplasma pneumoniae, Leptospira spp., Borrelia burgdorferi, Treponema pallidum, Helicobacter pylori, Toxoplasma gondii, Pneumocystis jiroveci* etc.

BCU "ASISTENTA LIBRARY"

21. TESTAREA IMUNITĂȚII DE TIP CELULAR

Există o serie de metode utile pentru evaluarea răspunsului imun de tip celular (RIC). Evaluarea RIC este necesară atât în situaţia unor pacienţi la care se suspicionează prezenţa unei stări de imuno-deficienţă, cât şi în anumite boli transmisibile care se pot însoţi de modificări fiziopatologice a RIC. Datorită faptului că în momentul de faţă au fost puse la punct variante terapeutice care pot influenţa în mod favorabil răspunsului imun, este necesar să avem la dispoziţie modalităţi de identificare a deficienţelor imune.

În vederea stabilirii unui astfel de diagnostic, cel mai frecvent pornim de la o suspiciune care poate fi clinică, iar asocierea unei infecţii cu agenţi etiologici consideraţi „oportunişti" poate să reprezinte semnalul pentru declanşarea diferitelor investigaţii. Spre exemplu, infecţiile cu *Pneumocystis jiroveci* sau *Cryptococcus neoformans* pot „trăda" o afectare a limfocitelor T, infecţiile repetate, purulente cu *Staphylococcus aureus, Pseudomonas cepacia, Serratia marcescens, Aspergillus spp.* ar putea fi datorate unor suferinţe ale celulelor fagocitare etc.

Având în vedere cele de mai sus, investigarea pacientului la care se suspicionează o imuno-deficienţă ar trebui să fie realizată prin următoarele activităţi:

- Aplicarea anamnezei pe parcursul căreia ar trebui să aflăm date privind medicaaţia primită de respectivul pacient, momentul debutului suferinţei respective, antecedentele heredocolaterale, date privind vaccinările efectuate (vezi şi capitolul 22), date privind agenţii etiologici izolaţi şi identificaţi ulterior etc. Adeseori anamneza are o importanţă crucială.
- Examenul clinic, pornind de la cunoaşterea înălţimii şi greutăţii pacientului investigat comparând cu valorile considerate normale pentru vârsta respectivă, prezenţa unor semne clinice sugestive (la nivelul feţei, dentiţiei şi evoluţiei acesteia, la nivelul tegumentului şi anexelor acestuia, la nivelul scheletului, organelor interne care pot fi examinate clinic etc);
- Examene de laborator (numărul elementelor figurate: hematii, granulocite, trombocite; formula leucocitară, aspectul pe frotiul realizat din sângele periferic, VSH etc):
  - studiul mai aprofundat limfocitelor şi subpopulaţiilor limfocitare CD3+, CD4+, CD8+ etc (număr, procent) prin metode clasice şi moderne (ex. flow-citometrie);
  - studiul funcţiei subpopulaţiilor limfocitare (prin metode clasice şi moderne);
  - determinarea numărului de celule formatoare de anticorpi faţă de antigene timodependente (plaje hemolitice);
  - studiul funcţiei celulelor fagocitare (aderare, inhibiţia aderării, inhibiţia migrării macrofagelor sau leucocitelor, deficienţe la nivelul granulaţiilor, deficienţe în mieloperoxidază, deficienţe în NADPH oxidază, eliberarea radicalilor de oxigen activi de către celulelor fagocitare nestimulate şi/sau stimulate cu zimosan, lectine etc);
  - evaluarea activităţii citotoxice a celulelor NK şi K (citotoxicitatea naturală mediată celular, citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă/ADCC, citotoxicitatea specifică faţă de celule tumorale sau normale/prin eliberare de ^{51}Cr, indu-

cere de limfocite T Citotoxice *in vitro* prin culturi stimulate cu antigene tumorale și IL-2 etc);

- studii privind reactivitatea celulelor implicate în răspunsul imun de tip celular apreciată prin incorporarea de timidină tritiată de către limfocitele stimulate cu diverși mitogeni, lectine care se leagă de membrana celulară (fitohemaglutinină, concavalină A etc), substanțe care acționează direct fără a necesita existența unor componente membranare, diferite antigene (PPD, candidină etc), citokine (IL-2), celule allogenice etc;
- studiul secreției de citokine, modalitate indirectă de apreciere a funcției celulelor implicate în răspunsul imun de tip celular etc.

- Teste imunobiologice, prin tehnica intradermoreacției (IDR), folosind antigene care stimulează răspunsul imun de tip celular („întârziat"); în literatura internațională este recomandată o „baterie" de antigene, patru-cinci dintre antigenele menționate în continuare;
  - Candidină (antigen extras din *Candida albicans*, un extract apos realizat în diluție 1/10; antigenul este numit și „Dermatophyton O");
  - Coccidioidină (antigen extras din *Coccidioides immitis)* care însă poate interfera cu testele serologice realizate pentru histoplasmoză;
  - Histoplasmină (antigen extras din *Histoplasma capsulatum)* care produce și o creștere a titrului anticorpilor fixatori de complement;
  - Antigenul extras din virusul urlian;
  - Fitohemaglutinină (mai rar folosită *in vivo);*
  - Lizat din cultură de *Staphylococcus aureus;*
  - O combinație între streptokinază și streptodornază;
  - Toxoid tetanic, cu concentrația de 10 limes floculans/ml (diluat);
  - Toxoid difteric, cu concentrația de 30 limes floculans/ml (nediluat); pentru ultimele 2 antigene pot apărea reacții de hipersensibilitate de tip umoral ceea ce poate crea probleme importante în ceea ce privește evaluarea răspunsului imun de tip celular;
  - Tricofitină (extras din *Trichophyton spp.);*
  - Tuberculină (derivat proteic purificat, PPD, extras din cultura de *Mycobacterium tuberculosis);*

În cele ce urmează vom discuta despre **IDR** cu **PPD**.

Principiul metodei

Tuberculina reprezintă un amestec relativ bine standardizat de antigene proteice mycobacteriene, utilizat în mod curent pentru decelarea infecției tuberculoase (TB), individual sau populațional. Acest extract se poate utiliza în cadrul unei „baterii" de teste IDR pentru evaluarea reactivității din punct de vedere al RIC. După ce o persoană dată se infectează cu mycobacterii, urmează sensibilizarea și proliferarea anumitor populații de limfocite T (LT). Injectarea intradermică a tuberculinei stimulează LT și declanșează o serie de evenimente ce conduc la un apariția unui RIC și a unor manifestări de hipersensibilitate de tip IV.

Reacţiile implică vasodilataţie, edem şi infiltrat cu limfocite, bazofile, macrofage, neutrofile. LT antigen-specifice proliferează şi eliberează limfokine care mediază acumularea locală a diferitelor alte celule. Răspunsul maxim se constituie la circa 48 ore după injectare. Aria **indurației** (infiltratului celular) reflectă hipersensibilitatea de tip întârziat. Eritemul reprezintă o reacţie inflamatorie acută, cauzată de vasodilataţia capilară iar apariţia eritemului nu va fi interpretată drept o reacţie pozitivă. Limfocitele sensibilizate ating un nivel adecvat pentru a conduce la apariţia unui răspuns interpretabil după 2-4 săptămâni de la infecţia iniţială cu *M. tuberculosis*. Sensibilitatea poate persista mai mulţi ani, dar reactivitatea scade de regulă o dată cu vârsta.

Materiale şi reactivi necesari

Pornind de la tuberculina preparată de Koch (**Old-tuberculin,** 1891), în 1901 a fost realizat produsul **New tuberculin,** iar ulterior derivatul proteic purificat (**PPD-S,** preparat de Seibert în anul1941), adoptat ca Standard Internaţional pentru PPD. Metoda de obţinere a fost reprezentată de precipitarea proteinelor din filtratul mediului de cultură concentrat la cald, cu soluţie 50% sulfat de amoniu. Unitatea internaţională pentru PPD este definită drept activitatea biologică conţinută în 0,000028 mg de PPD-S (0,00002 mg PPD + 0,000008 mg săruri). **PPD-RT 23** reprezintă lotul de tuberculină purificată în anul 1958 în Danemarca şi asigură omogenitatea produsului antigenic folosit în studii epidemiologice în lumea întreagă. Din produsul realizat iniţial se prepară diluţiile necesare (etalonate) la care se adaugă Tween 80 în scopul reducerii absorbţiei pe peretele de sticlă al fiolei. În mod uzual se utilizează 2 UI/doză, echivalentul a 5 UI PPD-S. În raport cu PPD-RT23, în România se utilizează **PPD IC-65** produsă de către INCDMI „Cantacuzino".

Tehnica de lucru

În ţara noastră se utilizează tehnica injectării intradermice (Mantoux).

- controlăm produsul biologic pe care urmează să îl utilizăm din punct de vedere al perioadei de eficacitate şi conservării în condiţiile prevăzute de către producător;
- utilizăm numai seringi cu volumul de maxim 1 ml şi cu diviziuni clar marcate, cel puţin pentru fiecare 1/10 ml precum şi ace pentru injecţie intradermică, de unică întrebuinţare;
- agităm energic fiola pentru a omogeniza concentraţia produsului biologic, ştiut fiind că în timpul unei conservări mai îndelungate tuberculina tinde să se absoarbă pe pereţii de sticlă ai fiolei;
- aspirăm în seringă o cantitate suficientă de soluţie pentru a putea elimina integral orice bulă de aer apărută între piston şi orificiul acului;
- poziţionăm acul astfel încât bizoul să fie aliniat diviziunilor seringii;
- antiseptizăm cu alcool (minim 3 minute) o arie situată pe faţa anterioară a antebraţului stâng, la unirea treimii medii cu cea superioară;
- cuprindem zona respectivă a antebraţului în palmă, întinzând pielea cât mai uniform între extremitatea inferioară a eminentei tenare şi hipotenare pe de o parte şi cele patru degete strâns lipite, pe de altă parte;
- pătrundem cu acul aproape tangent la suprafaţa antebraţului, cu bizoul în sus, până acesta este situat în derm;

- eliberăm tegumentul şi fixăm seringa presând-o pe antebraţul subiectului, având grijă să nu se acopere diviziunile seringii pentru a putea urmării cantitatea injectată;
- injectăm strict 0,10 ml; dacă injectarea s-a făcut strict intradermic apare o bulă uşor denivelată, cu margini relativ abrupte, cu aspect de coajă de portocală şi diametru de 5-8 mm; în lipsa apariţiei acestei bule (în cazul injectării hipodermice sau când se pierde soluţie între seringă şi acul incorect montat), este recomandat să se reia manevra cu mai multă atenţie, repetând injectarea la o distanţă de 3-5 cm sau la antebraţul opus.

La persoanele infectate anterior (sensibilizate), la locul injectării apare o reacţie constând din eritem-edem-**indurație** începând după circa 6 ore şi atingând un nivel maxim după circa 36-60 ore, care se retrage în următoare câteva zile. Pe locul reacţiei poate persista o perioadă îndelungată o zonă de hiperpigmentaţie.

Citirea rezultatului

Citirea rezultatului se face de regulă după 72 ore, asigurând o bună iluminare a zonei examinate (este de preferat lumina naturală). Recomandăm o primă citire la 24 ore (pentru a surprinde o eventuală hipersensibilitate de tip umoral faţă de antigenul inoculat care are structură proteică), o a doua citire la 48 ore şi citirea finală la 72 de ore.

Identificăm existenţa unei eventuale arii intens eritemato-violacee care circumscrie zona în care am făcut inocularea. În cazul existenţei unei astfel de reacţii, apreciem tactil (prin mişcări repetate, atingând zona respectivă) cu pulpa policelui sau inelarului limitele zonei de infiltraţie dermică (percepută ca fiind reliefată) corespunzând din punct de vedere histopatologic inflamaţiei (edem, limfocite, macrofage, PMN) şi care reprezintă reacţia nespecifică şi specifică faţă de antigenul injectat.

Măsurăm „diametrul maxim" al zonei de infiltraţie. Notăm şi semicantitativ intensitatea infiltraţiei dermice („tip Palmer"), semnificaţia fiind următoarea:

- tip I, indurație fermă sau prezenţa unei flictene;
- tip II, indurație elastică;
- tip III, infiltraţie depresibilă;
- tip IV, fără infiltraţie aparentă.

Citirea reacţiei tuberculinice reprezintă o evaluare subiectivă, existând posibilitatea unor importante variaţii inter- şi intraindividuale din partea persoanelor care efectuează lectura. Dubla citire „în orb" fără cunoaşterea rezultatului celeilalte lecturi, poate reduce variaţiile "grosiere", cu condiţia ca ambele persoane care „citesc" rezultatul să aibă experienţă cu această tehnică.

Interpretarea rezultatului testului tuberculinic (IDR cu PPD)

În funcţie de analizele statistice efectuate, există câteva recomandări cu privire la interpretarea IDR cu PPD.

Centrul de control şi prevenire a bolilor Atlanta-Georgia (CDC) a modificat relativ recent clasificarea reactivităţii la testul cutanat efectuat cu 5 UI PPD după cum urmează:

1. Reacţia este considerată a fi pozitivă dacă diametrul indurației este >5 mm în următoarele cazuri:

- persoane care au avut un contact recent cu un caz de TB;

- persoane cu semne radiologice de TB;
- persoane infectate cu HIV.

2. Reacţia este considerată a fi pozitivă dacă diametrul induraţiei este ≥10 mm în cazul persoanelor care nu intră in categoriile menţionate mai sus dar au alţi factori de risc, spre exemplu:

- persoane născute în ţări în care prevalenţa TB este crescută (din Asia, Africa, America Latină, Europa de Est etc);
- persoane care folosesc droguri inoculate pe cale injectabilă;
- persoane fără adăpost sau care locuiesc în azile sau în instituţii corecţionale;
- persoane care prezintă afecţiuni care cresc riscul apariţiei TB (silicoză, diabet zaharat, boli hematologice şi ale sistemului reticuloendotelial, malnutriţie) sau sunt tratate cu medicamente imunosupresive.

3. Reacţia este considerată a fi pozitivă dacă diametrul induraţiei este ≥ 15 mm în cazul altor situaţii decât cele menţionate mai sus

NB. Persoanele infectate cu alte tipuri de mycobacterii pot prezenta reacţii pozitive după IDR cu PPD, însă de regulă diametrul induraţiei este <10 mm, excepţiile (diametru >10 mm) putând apare în special la debutul infecţiei.

În ţara noastră se consideră drept pozitive reacţiile atunci când diametrul este ≥ 9 mm. Această definiţie convenţională se bazează pe rezultatele unor testări efectuate pe eşantioane semnificative statistic, la care analiza epidemiologică a distribuţiei valorilor a arătat că plasarea limitei între valorile de 9-10 mm separă cel mai bine cele 2 categorii (neinfectaţi şi infectaţi) asigurând cel mai scăzut procent de rezultate fals pozitive şi respectiv fals negative. Clasificarea indivizilor dintr-o populaţie în negativi şi pozitivi la testul tuberculinic serveşte la măsurarea extinderii infecţiei TB în acea populaţie (prevalenţa infecţiei) oferind un plus de informaţie prin analiza separată pe grupe de vârstă. Dacă se repetă determinarea prevalenţei infecţiei pe vârste la intervale definite de timp, dinamica prevalenţei infecţiei în fiecare cohortă permite determinarea riscului anual de infecţie, indicator fiabil al evoluţiei endemiei tuberculoase.

În ceea ce priveşte investigarea reactivităţii din punctul de vedere al RIC pentru un anumit subiect, la care s-a utilizat o „baterie" de antigene, dacă spre exemplu rezultatul este „negativ" pentru fiecare dintre cele 4-5 antigene folosite se poate presupune faptul că subiectul respectiv este anergic în ceea ce priveşte RIC şi se recomandă efectuarea unor investigaţii suplimentare.

BCU IAŞI

22. BIOPREPARATE

Produsele biologice de uz uman sunt preparate obţinute pe scară mai mică (de ex. la nivelul unui laborator în care sunt asigurate normele de asigurare a calităţii stabilite la nivel internaţional) sau pe scară mai largă, în instituţii specializate. Aceste produse sunt obţinute din diferite microorganisme (ex. bacterii, virusuri), din macroorganisme sau prin intermediul unor tehnici de inginerie genetică. Produsele imunobiologice (biopreparate) se pot clasifica după mai multe criterii.

Spre exemplu, în funcţie de **scopul urmărit,** putem descrie o serie de reactivi utilizaţi în diagnostic sau diferite produse utilizate în profilaxia sau tratamentul bolilor infecţioase. Dintre reactivii de diagnostic:

- unii se pot utiliza *in vitro* (ex. serurile imune utilizate în identificarea microorganismelor pe baza caracterelor antigenice ale acestora, prin reacţii antigen-anticorp; vezi capitolele 15-20);
- în timp ce alţi reactivi sunt utilizaţi *in vivo* (ex. PPD sau alte produse inoculate intradermic pentru evidenţierea răspunsului imun de tip celular sau umoral; vezi capitolele 19 şi 21).

Dintre produsele utilizate în profilaxia şi/sau tratamentul bolilor infecţioase putem aminti:

- serurile hiperimune,
- vaccinurile şi
- imunomodulatorii.

Produsele imunologice s-ar mai putea clasifica după **starea fizică, biologică, numărul componentelor** incluse dar există şi **alte criterii** pentru clasificare.

Dintre produsele biologice de uz uman vom discuta în special despre seruri, vaccinuri şi imunomodulatori. În final vom enumera o serie de produse realizate de către Institutul Naţional de Cercetare - Dezvoltare pentru Microbiologie şi Imunologie (INCDMI) "Cantacuzino".

Serurile imune

Serurile imune utilizabile în scop terapeutic pot fi omologe sau heterologe. În momentul actual, cel mai frecvent sunt folosite serurile imune heterologe obţinute prin imunizarea (hiperimunizarea) unor animale perfect sănătoase, utilizate numai în acest scop (cel mai frecvent sunt utilizaţi cai). În vederea hiperimunizării putem utiliza spre exemplu anumite toxine sau anatoxine.

Imunoterapia reprezintă un mijloc terapeutic eficace, în anumite situaţii fiind indispensabilă. Imunoterapia este de obicei pasivă (administrarea de anticorpi gata formaţi) bazându-se pe utilizarea de:

- imunoglobuline standard
- obţinute din placentă sau din sângele donatorilor (concentrate de Ac)

- de regulă folosite în scop profilactic
- pot fi utilizate în tratamentul asociat al unor infecţii severe (ex. sepsis)

- imunoglobuline specifice (hiperimune)
  - obţinute de la persoane imunizate (natural sau artificial) cu un anumit Ag
  - pot fi utilizate în tratamentul tetanosului, rabiei, varicelei, formelor severe de herpes zoster, infecţiilor cu virusul citomegalic, infecţiei cu virusul sinciţial respirator etc
- seruri imune heterologe
  - obţinute de la animale imunizate (hiperimunizate) artificial
  - sunt utilizate în tratamentul unor boli în care rolul esenţial aparţine unei exotoxine (difterie, tetanos, botulism, gangrenă gazoasă etc).

Spre exemplu, principala resursă terapeutică în difterie este reprezentată de administrarea de ser imun anti-difteric, în dozele corespunzătoare calculate fie pe kilogram-corp fie în funcţie de anumite aspecte clinice. Este necesar un diagnostic foarte rapid (dar tratamentul începe chiar şi în lipsa diagnosticului de certitudine, în cazul suspiciunii clinice) şi administrarea de antitoxină difterică. Doza în terapia difteriei depinde de sediul infecţiei (ex. 20-40.000 UAI pe cale i.v. în cazul localizării faringiene, în primele 24 de ore de la debut şi respectiv 40-80.000 UAI pe cale i.v. în cazul localizării laringiene, în cazul difteriei maligne şi respectiv atunci când de la debut au trecut 48 de ore).

Vaccinurile

Vaccinurile sunt produse biologice administrate în special în scop preventiv.

Prin Ordonanţa Guvernului nr. 53 din 30 ianuarie 2000 (redactată şi propusă pentru aprobare de către autorul acestui manual) a fost instituită obligativitatea raportării bolilor şi a efectuării vaccinărilor. Acest act normativ a devenit Legea nr. 649 din 20 noiembrie 2001, după aprobarea Parlamentului României. Am considerat necesară sublinierea poziţiei medicilor de familie (indiferent dacă lucrează în sistemul public sau privat) în raport cu sistemul de raportare şi programul naţional de imunizări precum şi instituirea unui registru unic de vaccinări şi respectiv a carnetului de vaccinări (au existat iniţiative în realizarea utilizarea carnetului de vaccinări şi înainte de anul 2000 în câteva judeţe ale ţării şi respectiv în municipiul Bucureşti). Ordonanţa Guvernului nr. 53/2000 şi respectiv aprobarea acesteia prin Legea nr. 649/2001 reprezintă o referinţă din punct de vedere legislativ pentru sistemul de sănătate publică din România.

În ceea ce priveşte schemele de vaccinare recomandate pentru copii, adolescenţi şi tineri, vom prezenta câteva exemple.

În maternitate, la nou născuţii în vârstă de 0-7 zile se vor administra vaccinul BCG şi prima doză de vaccin pentru prevenirea hepatitei cu virusul B (HepB), dozele ulterioare de HepB fiind administrate la 2 şi respectiv 6 luni.

Simultan cu HepB, conform recomandărilor naţionale şi internaţionale, la vârsta de 2 şi 6 luni se vor administra doze vaccinale pentru prevenirea infecţiei cu virusul polio (VPO) şi respectiv prevenirea difteriei – tetanosului– tusei convulsive (DTP) în timp ce la vârsta de 4 luni se vor administra simultan DTP şi VPO. Următoarea doză de vaccin VPO se va

administra la 12 luni, simultan cu DTP în timp ce ultima doză de DTP se va administra la copilul cu vârsta cuprinsă între 30 şi 35 de luni.

Sugarul în vârstă de 9-12 luni va primi vaccinul pentru prevenirea rujeolei, iar copilul în vârstă de 7 ani (la intrarea în clasa I) va primi simultan o nouă doză de vaccin rujeolos şi bivaccinul DT.

Pentru reducerea incidenţei hepatitei cu virusul B (şi în consecinţă şi a hepatitei cu virusul delta), în clasa a III-a copiii nevaccinaţi primesc trei doze de HepB, prima dintre ele simultan cu o nouă doză de VPO, iar elevii şcolilor sanitare postliceale şi respectiv studenţii facultăţilor cu profil medical, primesc 3 doze de HepB în primul an de studiu. Am introdus această politică de vaccinare în România prin ordin al ministrului sănătăţii în anul 1999, strategia fiind ulterior inclusă în acte normative de nivel superior.

Prevenirea difteriei şi tetanosului se realizează prin vaccinarea copiilor în clasa a VIII-a (la vârsta de 14 ani) cu rapeluri ulterioare la fiecare 10 ani sau de câte ori este necesar în funcţie de recomandările tehnice naţionale şi internaţionale. Cu privire la revaccinarea cu vaccinul BCG, aceasta se va realiza în colaborare cu programul naţional de prevenire şi control al tuberculozei.

Imunomodulatorii

În privinţa obţinerii substanţelor cu efect imunomodulator s-a pornit de la observaţia că unele infecţii (bacteriene) stimulează în mod nespecific organismul gazdă şi conducând la apariţia unei „rezistenţe" faţă de alţi agenţi infecţioşi sau chiar şi faţă de apariţia unor metastaze neoplazice. Ulterior s-a demonstrat că structuri aparţinând şi altor organisme (fungi, alge) sau diferiţi compuşi chimici prezintă proprietăţi asemănătoare.

Pe baza datelor acumulate au fost puse la punct conceptele de bază privind imunomodularea şi substanţele imunomodulatoare. Astfel, se consideră că: a. terapia nespecifică este utilă menţinerii homeostaziei; b. agenţii utilizaţi, imunomodulatorii, menţin funcţiile imune în limite normale (activându-le atunci când scad sub pragul inferior al valorilor normale sau inhibându-le atunci când depăşesc pragul superior); c. un imunomodulator trebuie să aibă o serie de calităţi (să nu fie antigenic, să nu conducă la apariţia fenomenului de hipersensibilitate, să nu genereze reacţii adverse, să poată fi administrat concomitent cu alt antigen folosit în scop terapeutic, să fie cât mai uşor de produs iar preţul de cost să fie rezonabil).

Primii imunomodulatori de origine bacteriană au inclus suspensii ale tulpinii vaccinale obţinute din *Mycobacterium tuberculosis*, respectiv tulpina BCG. Au mai fost utilizate şi suspensii obţinute din *Corynebacterium parvum*. Imunomodulatorii au fost puşi la dispoziţia sistemului medical atât sub formă de preparate monomicrobiene cât şi sub formă de preparate polimicrobiene. Dintre preparatele polimicrobiene amintim cele cunoscute sub numele de: Omnadin, Bronhodin, Aerodin, Polidinul, Broncho-vaxom, ICB-10 etc.

Spre exemplu, Broncho-vaxomul este o suspensie alcătuită din specii bacteriene distruse prin diferite tehnici (*Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Neisseria catarhalis* etc). Acest produs este recomandat în prevenirea şi terapia unor infecţii ale căilor respiratorii inferioare şi superioare. Aerodinul conţine un amestec de 10 specii bacteriene (*Streptococcus pyogenes, Streptococcus faecalis, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Neisseria catarrhalis, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Proteus*

0X19), distruse prin căldură, parţial lizate, concentraţia fiind de circa 11 miliarde germeni/ml. Aerodinul este condiţionat sub formă de suspensie nazală pentru aerosoli şi instilaţii. Este recomandat pentru prevenirea infecţiilor nespecifice ale căilor respiratorii dar şi pentru pregătirea preoperatorie în intervenţiile chirurgicale ORL. Polidinul are în componenţa sa 13 tulpini bacteriene distruse prin căldură (o fiolă conţine circa 48 de milioane germeni/ml). Polidinul este încă utilizat în prevenirea sau terapia infecţiile acute ale căilor respiratorii superioare sau a infecţiilor genitale.

Ulterior, s-a arătat că şi diferite extracte bacteriene (în special localizate la nivel parietal) pot fi utilizate ca imunomodulatori. Astfel a fost obţinut Cantastimul produs de către INCDMI „Cantacuzino", pornind de la o tulpină foarte virulentă de *Pseudomonas aeruginosa.* Acest produs normalizează funcţiile fagocitare şi secretorii ale macrofagelor, funcţiile citotoxice ale celulelor NK şi T citotoxice (CD8+), cooperările intercelulare, activitatea limfocitelor T helper (CD4+) şi limfocitelor B (CD19+).

În categoria imunomodulatorilor intră şi diferite produse pentru care în momentul de faţă sunt cunoscute structurile moleculare, precum: tuftsina, timopoietinele, timozinele, leucotrofina, interferonul, interleukinele, factorii de necroză ai tumorilor, factorii de creştere a macrofagelor şi/sau granulocitelor (MG-CSF).

Pornind de la diferitele molecule naturale identificate ca fiind utile, studii aprofundate au permis obţinerea unor produse sintetice sau identificarea efectelor imunomodulatoare pentru unele substanţe care fuseseră produse iniţial cu un alt scop. Spre exemplu, levamisolul (Decaris) este un medicament antiparazitar. Substanţa activă din acest medicament are efecte imunomodulatoare deoarece influenţează mecanismele de apărare a gazdelor aflate în hipofuncţie imună (ex. din cauza vârstei înaintate sau a unor boli) modulând în special RIC. Efectul imunomodulator se realizează consecutiv restaurării funcţiilor macrofagelor, limfocitelor T, granulocitelor PMN etc, exprimat printr-o mai bună secreţie de limfokine sau sinteza diferitelor substanţe cu structură proteică prin activarea fagocitozei, activarea mobilităţii celulelor fagocitare etc.

Este important ca imunomodulatorii să fie utilizaţi în mod corespunzător şi să se ţină seama atât de beneficiile care pot fi obţinute cât şi de limitele existente. Modul de administrare este destul de variat, în funcţie de substanţa activă şi efectul dorit. Imunomodulatorii pot fi inoculaţi intratumoral, peritumoral, la distanţă de o tumoră solidă aşa cum pot fi administraţi şi sistemic prin injecţii intramusculare, subcutanate, intradermice, iar în unele cazuri chiar pe cale digestivă.

Produse realizate de INCDMI „Cantacuzino"

În anul 2004, INCDMI „Cantacuzino", conform tradiţiei de aproape un veac a realizat numeroase produse strict necesare sistemului de sănătate din România. Dintre acestea vom aminti o mai mică parte, după cum urmează:

1. Produse medicamentoase imunologice de uz uman

- vaccinuri (BCG liofilizat, DTP, DT, dT, gripal, dizenteric viu oral, rabic, rujeolos etc);
- seruri terapeutice (anticărbunos, antidifteric, antirabic, antitetanic în două variante etc);
- imunomodulatori (Aerodin în două variante, Bronhodin, Cantastim, Imunostimulator cu Candidină, Orostim etc);

- antigene pentru intradermoreacţie (PPT IC 65 de 2UT şi 10UT);

2. Reactivi biologici pentru diagnostic *in vitro*

- antigene pentru diagnostic (Ag brucelos pentru diagnostic serologic, Ag cardiolipinic pentru VDRL, Ag *Coxiella burnetti* pentru RFC, Ag *Chlamydia psitacii* pentru RFC, Ag gripal, Ag *Leptospira patoc*, Ag *Mycoplasma pneumoniae* pentru RFC, Ag *Pertussis*, Ag *Salmonella* grupele A, B, D, Ag. *Salmonella H*, Ag *Salmonella Vi*, SLO activată şi liofilizată etc);

- seruri pentru diagnostic in vitro (hemolizină anti-oaie, seruri aglutinante anti EPEC mono şi polivalente, ser aglutinant anti-*Shigella* shiga, ser anti-*Proteus* OX19, OX2 şi OXK, ser anti-*Yersinia pseudotuberculossis*, ser anti-*Yersinia enterocolitica*, ser antidifteric pentru testul ELEK, ser aglutinant anti-*Haemophilus influenzae* polivalent sau anticapsular de tip a-f, ser fluorescent antirabic, ser aglutinant anti-holeric grup O1, seruri anti-*Salmonella* diferite grupuri şi tipuri, ser anti-EHEC etc).

- reactivi pentru diagnostic imunochimic (ser uman de referinţă IC, ser de referinţă pentru proteina C reactivă, ser de referinţă pentru α1-fetoproteină umană, ser monospecific anti-IgA umană etc);

- enzime (enzimă distrugătoare de receptori, penicilinază liofilizată în două concentraţii);

- medii pentru culturi celulare (soluţii Hancks, soluţie EDTA, mediu IC 65 cu tampon Hancks etc);

- medii de cultură pentru diagnostic bacteriologic (peste 100 de produse diferite);

- suplimente pentru medii de cultură (supliment Tinsdale, supliment tip HYL, supliment tip Fildes, amestec reducător pentru anaerobioză etc).

3. Animale de laborator (şoareci non-consangvini, şoareci consangvini, şobolani, hamsteri, cobai, iepuri etc);

4. Produse din sânge de animale (sânge defibrinat de berbec, sânge defibrinat de iepure, sânge lacat de cal, ser normal de bou, ser normal de cal, ser normal de iepure etc).

BCU IASI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

PARTEA SPECIALĂ

23. INTRODUCERE ÎN DIAGNOSTICUL DE LABORATOR MICROBIOLOGIC

În prima parte a manualului am prezentat date privind bazele diagnosticului în microbiologie, studiul microbiologic direct şi respectiv evaluarea răspunsului gazdei faţă de infecţie. Având la bază aceste cunoştinţe, în capitolele următoare vom discuta pe rând diagnosticul de laborator al infecţiilor produse de principalele microorganisme studiate.

Pentru fiecare dintre capitolele 24-52 vom utiliza schema de diagnostic prezentată în capitolul 5, schemă pe structura căreia am discutat de altfel şi diferitele aspecte din partea generală. Utilizarea în mod repetat a unei scheme clare permite o mai bună fixare a cunoştinţelor. Microbiologia este, după părerea noastră, o ştiinţă cu foarte mare aplicabilitate practică. Elementele de bază ale microbiologiei sunt necesare şi utile pentru toţi cei implicaţi în sistemul sanitar; cunoaşterea acestor elemente de bază ar putea preveni o serie de anomalii şi erori care uneori sunt dezastruoase (aşa cum s-a întâmplat de ex. într-o maternitate în care o serie de nou-născuţi au decedat datorită unor infecţii de spital).

Dacă în urmă cu circa 30 de ani a început să se considere la nivel internaţional (în mod eronat) că problemele legate de bolile infecţioase sunt din ce în ce mai puţin importante, eroare care a creat şi crează încă mari probleme în sănătatea publică, în ultimii 5-6 ani (în special începând cu anul 1998) s-a înţeles că bolilor transmisibile trebuie să li se reacorde importanţa cuvenită. Astfel, inclusiv la nivel european, au fost elaborate numeroase acte normative în acest domeniu iar fondurile alocate au sporit substanţial, încercând să se amelioreze situaţia creată datorită erorilor anterioare.

Şi în ţara noastră, preocuparea faţă de sănătatea publică în general şi faţă de microbiologia în sănătatea publică în mod particular a crescut după anul 1997. Activitatea desfăşurată în domeniul reformei pentru sănătatea publică în România este, din acest punct de vedere, destul de aproape de reforma care are loc restul Europei. Diferitele proiecte şi programe iniţiate în special în perioada 1997-2000 îşi găsesc şi astăzi concretizarea în aplicarea unor măsuri cu mare importanţă la nivel naţional: reabilitarea centrelor de referinţă pentru microbiologie, reforma sistemului de supraveghere a tuberculozei, adaptarea la standarde internaţionale a sistemului de diagnostic, prevenire şi control pentru bolile cu transmitere sexuală, menţinerea la un nivel corespunzător a imunizărilor pentru a preveni bolile prevenibile prin vaccinare, includerea României în sistemul de pregătire în scopul supravegherii bolilor transmisibile la nivel european etc.

Din anul 1999 România face parte (ca membru fondator) din Reţeaua de supraveghere a bolilor transmisibile în Balcani. În anul 2000, a fost organizată una dintre cele mai importante întâlniri cu scopul armonizării supravegherii bolilor infecţioase în Europa (Consensus Meeting on Surveillance of Infectious Diseases, Grottaferrata, Italia, 7 aprile 2000). Prezentarea pe care autorul prezentului volum a făcut-o cu acest prilej, discuţiile care au

urmat în „ateliere de lucru", întâlnirile cu factori de decizie ai Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii, Conferinţa internaţională „Health Issues of Joint Interest to Romania and the European Union" organizată în octombrie 2000, iniţiativa organizării unei reţele de supraveghere a bolilor transmisibile în ţările din Europa Centrală şi de Est (întâlnire plenară pe care am organizat-o în decembrie 2000, în Bucureşti) au condus la elaborarea unui program de reformă în domeniul supravegherii bolilor transmisibile cu sprijin european (PHARE) care a fost aprobat de asemenea în anul 2000.

Chiar dacă reprezintă o măsură pentru prevenirea unor maladii virale (şi nu bacteriene sau fungice) vom mai aminti dintre măsuri luate în ultimii ani îmbunătăţirea programului de vaccinare împotriva infecţiilor cu virusul hepatitei B, în anul 1999. Vaccinarea nou-născuţilor avea deja o „vechime" de 4 ani, dar în 1999 prin politica dusă în domeniul sănătăţii publice a fost inclusă şi vaccinarea copiilor din clasa a III-a, vaccinarea tuturor elevilor din anul I de la şcolile sanitare postliceale şi respectiv a studenţilor din anul I din facultăţile de medicină şi stomatologie. Această politică va duce ca în numai câţiva ani, un mare număr de generaţii de copii să fie vaccinate faţă de o infecţie care devenise endemică la nivelul anilor '90.

Fiecare din aspectele menţionate are o strânsă legătură atât cu microbiologia cât şi cu sănătatea publică şi merită a fi cunoscute de către medicii şi viitorii medici din sistemul sanitar românesc.

În bolile infecţioase (transmisibile) diagnosticul are o importanţă considerabilă, deoarece de stabilirea corectă şi precoce a diagnosticului depind atât vindecarea bolnavului, cât şi succesul măsurilor preventive care trebuie iniţiate cât mai rapid posibil. Spre exemplu, ignorarea primului caz al unei boli infecţioase grave (ex. holeră) poate avea consecinţe epidemiologice foarte importante. Cu toate că în primii de studiu este abordată în mod special partea microbiologică (bacteriologică, virusologică, parazitologică, micologică) a diagnosticului, este strict necesar să menţionăm că examenul clinic îşi păstrează şi astăzi o deosebită valoare. În scopul diagnosticării bolilor infecţioase au fost puse la punct numeroase tehnici de laborator, metode paraclinice, precise şi obiective, dar utilitatea lor este maximă atunci când rezultatele sunt interpretate în contextul clinic şi epidemiologic.

În diagnosticul bolilor transmisibile trebuie respectate o serie de reguli, după cum urmează.

1. Obţinerea datelor (clinice, paraclinice şi de laborator) este urgentă. Anamneza trebuie realizată cu rigurozitate. Aprecierea statusului imunologic poate fi esenţială. Nici un element obţinut prin examenul obiectiv nu trebuie neglijat. 2. Datele obţinute trebuie privite ca un tot unitar; nu pot fi absolutizate nici posibilităţile clinice şi nici cele ale laboratorului. 3. Este indispensabil să se stabilească un diagnostic etiologic în toate maladiile infecţioase, având în vedere importanţa tratamentului antimicrobian. 4. Folosirea corectă a laboratorului constituie o altă regulă importantă. Este necesar ca fiecare medic clinician să ştie ce analiză să ceară, ce produse se recoltează de la bolnav, când şi cum să le recolteze, cum să le expedieze către laborator. Pentru obţinerea unor date corecte prin examenele de laborator, clinicianul va respecta câteva reguli: produsele se recoltează înainte de administrarea tratamentului antimicrobian; se trimite laboratorului o cantitate suficientă de produs pentru examinat; produsul patologic trimis trebuie să fie reprezentativ pentru boala respectivă (de exemplu, spută şi nu salivă în infecţiile respiratorii inferioare); produsul examinat nu trebuie contaminat cu alţi germeni în cursul recoltării sau al transportului (recoltare aseptică); expe-

dierea către laborator se face în condiţiile de conservare cerute pentru fiecare tip de produs patologic în parte; se solicită examinarea imediată a produselor transmise către laborator. 5. Trebuie să existe o **colaborare** strânsă şi continuă între clinician şi specialistul de laborator. Este necesară o informare clinică a omului de laborator de către clinician pentru orientarea studiilor în laborator şi pentru alegerea celor mai bune metode de identificare a agentului etiologic. În acelaşi timp, laboratorul trebuie să informeze clinicianul pe parcurs în legătură cu datele obţinute.

În cadrul examenelor de laborator, un loc prioritar este ocupat de **diagnosticul microbiologic (bacteriologic, micologic şi/sau imunologic)**, care va fi prezentat în continuare (vezi şi capitolul 5). Foarte pe scurt vom discuta câteva date referitoare la alte examene paraclinice, utile în diagnosticul bolilor infecţioase.

Diagnosticul citologic constă în punerea în evidenţă a unor aspecte celulare caracteristice, utilizând un produs prelevat de la bolnav. Spre exemplu, citodiagnosticul revărsatelor pleurale şi al LCR poate aduce date preţioase pentru elucidarea etiologiei unei pleurezii şi respectiv a unei meningite. Diagnosticul histologic implică biopsii (recoltate prin tehnică chirurgicală) sau puncţii-biopsii ale diferitelor organe (ficat, rinichi, plămân, ganglioni limfatici, fragmente vasculare, mucoasă digestivă sau respiratorie) care permit punerea în evidenţă a unor modificări structurale caracteristice, determinate de acţiunea agentului microbian. Dintre metodele de laborator nespecifice sunt utile în diagnosticul bolilor infecţioase hemograma, leucograma (cu modificări caracteristice în unele boli), viteza de sedimentare a hematiilor, testele de disproteinemie, diferite teste enzimatice, determinarea prezenţei proteinei C reactivă (beta-globulină care apare în ser în afecţiuni inflamatorii, neoplazii şi în procese necrotice), alte teste de inflamaţie (reactanţi de fază acută) etc.

Referitor la alte metode paraclinice vom aminti examenul radiologic care poate furniza date de valoare pentru bolile infecţioase cu participare pulmonară (pneumonii virale, febră Q, tuse convulsivă, pneumonie pneumococică etc). În diagnosticul bolilor infecţioase se mai pot folosi rectosigmoidoscopia, electroencefalografia, electrocardiografia, diferite determinări biochimice, examene oftalmologice, scintigrafia, ecografia, tomografia computerizată, tehnica de rezonanţă magnetică nucleară.

Diagnosticul de laborator microbiologic (ex. bacteriologic)

Diagnosticul de laborator în microbiologie poate fi un diagnostic bacteriologic (direct), un diagnostic imunologic (indirect) sau o combinaţie a celor două variante menţionate. Schema generală a diagnosticului de laborator microbiologic a fost discutată în capitolul 5 şi va fi aplicată concret în capitolele care urmează. Pentru fiecare microorganism/diagnostic în parte, din lista p.p. posibil de utilizat, vom alege pentru prezentare câte unul singur, considerat reprezentativ.

Principalele microorganisme pentru care se va studia diagnosticul microbiologic

Bacteriile studiate pot fi grupate după mai multe criterii, dar o variantă utilă este cea în care avem în vedere structura peretelui bacterian şi respectiv afinitatea acestuia faţă de diferiţi coloranţi.

Un prim grup important este cel care include cocii cu importanţă medicală, gram pozitivi (stafilococi, streptococi, pneumococi etc) şi respectiv gram negativi (meningococi şi gonococi etc).

Dintre bacteriile gram negative care au dimensiuni pe baza cărora nu pot fi încadrate drept coci sau bacili se află parvobacteriile, cocobacilii gram negativi *(Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Brucella spp.* etc).

Bacilii gram pozitivi care vor fi discutaţi se pot grupa în bacili nesporulaţi *(Corynebacterium diphteriae, Listeria spp.* etc) şi respectiv bacili gram pozitivi sporulaţi *(Bacillus anthracis, Clostridium spp.* etc).

Bacilii gram negativi studiaţi aparţin fie familiei enterobacteriilor *(E. coli, Salmonella spp., Shigella spp., Klebsiella pneumoniae, Proteus spp., Yersinia spp.* etc) fie sunt incluşi în genuri separate precum *Vibrio cholerae* din genul *Vibrio* sau *Pseudomonas aeruginosa* din genul *Pseudomonas.*

Microorganismele din genul *Mycobacterium* se pot colora (cu dificultate) prin metoda Gram, dar în mod caracteristic se colorează prin metoda Ziehl-Neelsen. Specia principală studiată este reprezentată de *M. tuberculosis.*

O serie de bacterii spiralate (ex. *Treponema pallidum, Leptospira spp., Borrelia spp.)* nu se colorează prin metoda Gram datorită structurii particulare a peretelui. Pot fi studiate microscopic fie în preparate proaspete (utilizând tehnici microscopice speciale) fie utilizând coloraţii particulare (ex. impregnarea argentică).

Până în urmă cu o perioadă de timp microorganismele aparţinând genurilor *Rickettsia, Chlamydia* şi *Mycoplasma* erau incluse în categoria virusurilor. Totuşi proprietăţile lor fundamentale fac să le studiem astăzi între bacterii.

În obiectul de studiu sunt încadraţi şi fungii (ciupercile) care au o serie de caracteristici aparte. Noţiunile legate de diagnosticul micologic sunt prezentate mai pe larg în tratatele de specialitate.

24. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *STAPHYLOCOCCUS*

Stafilococii sunt coci gram-pozitivi aerobi, facultativ anaerobi, imobili, nesporulați, catalazo-pozitivi. Genul *Staphylococcus* cuprinde mai multe grupe de microorganisme de interes medical (unele dintre aceste grupuri incluzând mai multe specii). Cele mai cunoscute specii sunt reprezentate de: *Staphylococcus aureus; S. epidermidis; S. saprophyticus. S. aureus* reprezintă specia cel mai frecvent implicată în clinică. Există și alte specii nepatogene sau condiționat patogene. În funcție de capacitatea de a elabora coagulază, toți stafilococii coagulazo-pozitivi sunt grupați ca *S. aureus.*

Stafilococii pot deveni patogeni și se pot manifesta ca atare fie prin multiplicare și invazivitate, fie prin multiplicare și toxinogeneză (fiind posibilă și combinarea acestor mecanisme). Determinanții patogenității la stafilococ includ produsele toxice și enzimatice. *S. aureus* este implicat ca agent etiologic într-o mare varietate de infecții supurative (cu puroi), începând cu infecțiile superficiale ale tegumentelor și mucoaselor și continuând cu panariții, furuncule, abcese profunde, infecții ale diferitelor organe interne cu sau fără generalizarea infecției. Pe de altă parte, ar fi de menționat toxinozele (datorate în special toxinelor elaborate) și anume toxiinfecțiile alimentare, necroliza toxică a epidermului, sindromul de șoc toxic etc. Toxiinfecțiile alimentare sunt provocate de exotoxinele preformate, existente în alimente în care s-au multiplicat stafilococi enterotoxigeni. Stafilococii coagulazo-negativi (SCN) sunt implicați în infecții apărute după manevre medico-chirurgicale care penetrează bariera cutaneo-mucoasă (cateterisme, implante, protezări intravasculare etc). Ar mai fi de amintit infecțiile tractului urinar și genital cu *S. saprophyticus* (la femeile tinere). O infecție gravă produsă de SCN este enterocolita postantibiotice a nou născutului (mai ales a prematurului, la care administrarea necontrolată a antibioticelor poate produce disbacteriemii cu consecințe grave). Pentru a discuta diagnosticul de laborator în infecțiile produse de stafilococi vom alege drept reprezentative **infecțiile purulente ale tegumentelor și mucoaselor** și ne vom referi numai la *Staphylococcus aureus.*

Diagnosticul de laborator este numai bacteriologic, direct, cu următoarele etape.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid și corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie și antisepsie etc). În funcție de maladia provocată se pot recolta următoarele produse patologice: secreții purulente (din foliculite, abcese, celulite, fistule, infecții ale plăgilor și arsurilor), lichide (de puncție sinusală, otică, mastoidiană, articulară, peritoneală, pleurală, pericardică), exsudat nazal sau exsudat faringian, sânge, LCR, spută, urină, secreție vaginală, tampoane vaginale, lichid de vomă, materii fecale, alimente, prelevate de pe suprafața cateterelor și a inserțiilor iv. ale acestora. În continuare vom discuta cazul în care p.p. este reprezentat de **puroi** (vezi și capitolul 6).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie şi se notează prezenţa **celulelor** de la nivel tegumentar (eventual modificate faţă de normal), prezenţa **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite, piocite) şi prezenţa **cocilor gram-pozitivi,** cu diametrul de 0,5-1,5 µm, dispuşi în lanţuri scurte, perechi, izolaţi sau **în grămezi neregulate.** Cocii se pot situa intra sau extraleucocitar. Se are în vedere locul de unde a fost recoltat p.p. (puroiul poate fi necontaminat, dacă se recoltează de ex. prin puncţie-aspirare dintr-o colecţie purulentă profundă şi este foarte probabil contaminat cu floră de asociaţie dacă a fost recoltat dintr-o leziune superficială).

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Stafilococii se dezvoltă în general pe medii de cultură obişnuite în 18-24 ore, la 35-37°C. Coloniile au **aspect de tip S,** diametrul cuprins între 1-3 mm şi sunt pigmentate în funcţie de specia izolată (ex. pigment auriu). Pe mediul geloză-sânge, în jurul coloniilor poate apărea o zonă de hemoliză clară. Stafilococii se pot multiplica pe medii hipercloruRate, tolerând o concentraţie de 7-10% NaCl (ex. mediul Chapman).

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt cocci gram-pozitivi, cu diametrul de circa 0,5-1,5 µ, dispuşi în lanţuri scurte, perechi, izolaţi sau în grămezi neregulate
- Caractere de cultură: Produc colonii de tip S, pigmentate auriu; pe mediile cu sânge pot produce hemoliză.
- Caractere biochimice: Stafilococii au un metabolism glucidic atât respirator cât şi fermentativ. Fermentează glucoza, manitolul, xiloza, lactoza, zaharoza etc. cu producere de acid. Capacitatea de acidifiere a mediului conţinând manită este utilizată ca test de diferenţiere între *S. aureus* (**manito-pozitiv**) şi SCN (manito-negativ). Stafilococii aurii sunt catalazo-pozitivi (vezi 12.5.B). Se poate face şi testul fosfatazei. Există sisteme multitest care se pot procura comercial (API, Micro Scan, Minitek etc).
- Caractere antigenice: Se pot utiliza teste comerciale care includ fibrinogen şi IgG care cuplează coagulaza legată şi proteina A (tehnici de aglutinare indirectă).
- Caractere de patogenitate: Trebuie efectuat **testul coagulazei** (vezi capitolul 12, punctul 12.7); pentru identificarea exotoxinelor se poate utiliza o tehnică de tip ELISA sau aglutinarea pasivă inversată (vezi şi capitolul 11).
- Sensibilitatea la bacteriofagi: Susceptibilitatea la acţiunea litică a bacteriofagilor a fost sistematizată pentru tulpinile de *S. aureus* şi se poate testa la nivelul centrelor de referinţă.
- Alte caractere/teste utilizate în identificare: Se pot utiliza (în centre de referinţă) teste care se bazează pe proprietăţi fenotipice moleculare (studiul acizilor graşi celulari, al unor enzime sau al unor polipeptide totale) sau genotipice (fragmente de restricţie ale materialului genetic, hibridarea moleculară, ribotipia). S-au dezvoltat tehnici rapide utilizând truse de identificare şi instrumente automatizate pentru evidenţierea unor ele-

mente ale peretelui celular (proteina A, coagulaza legată), a enzimelor elaborate în aliment sau lichidul de hemocultură x(testul pentru termonuclează) şi a toxinelor (enterotoxine, TSST1, exfoliatine). Există metode care utilizează markeri moleculari pentru evidenţierea prezenţei MRSA (stafilococ rezistent la meticilină) şi pentru diferenţierea intraspecifică la *S. aureus* şi SCN.

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **este obligatorie** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice. În cazul unor infecţii grave trebuie să fie însoţită de alte determinări (vezi capitolul 14).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

25. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *STREPTOCOCCUS*

Streptococii sunt coci sferici gram-pozitivi care formează perechi sau lanțuri în cursul diviziunii celulare. Sunt larg răspândiți în natură. Unii fac parte din flora umană normală; alții sunt asociați cu afecțiuni umane importante datorate parțial infecției streptococice și parțial răspunsului imun al gazdei. Nu s-a elaborat un sistem perfect pentru clasificarea tuturor streptococilor. Dintre speciile cu importanță medicală ar fi de amintit *S. pyogenes* (grup A), *S. agalactiae* (grup B), *S. viridans* (care aparține florei normale), *S. pneumoniae* (pneumococul) etc. Enterococii aparțineau grupului D, însă în momentul actual fac parte dintr-un gen separat, genul *Enterococcus*. Streptococii sunt imobili, nesporulați și pot avea sau nu capsulă. În acest capitol vom discuta diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de *Streptococcus pyogenes*.

Cei mai mulți dintre streptococii care conțin antigenul de grup A sunt streptococi piogeni. Streptococii piogeni sunt beta-hemolitici (produc în mod caracteristic zone largi de hemoliză clară în jurul unor colonii de dimensiuni mici). De regulă streptococii piogeni sunt sensibili la bacitracină.

Streptococii sunt potențial implicați într-o mare varietate de boli. În principal streptococii piogeni pot deveni patogeni datorită multiplicării și capacității de invazivitate. Proprietățile biologice ale microorganismelor infectante, natura răspunsului gazdei și poarta de intrare a infecției au o mare influență asupra tabloului clinic. Infecțiile streptococice ar putea fi grupate astfel:

- Boli invazive, în care putem include faringita, angina streptococică, erizipelul, diferite infecții în sfera ORL, pneumonia, impetigo streptococic, celulita, fasceita necrozantă, febra puerperală, endocardita infecțioasă, sepsisul streptococic etc.
- Boli produse de streptococi lizogenizați, în care putem include scarlatina și sindromul de șoc toxic streptococic.
- Bolile poststreptococice care includ reumatismul articular acut (RAA) și glomerulonefrita acută poststreptococică (GNA). Diferiți autori iau în considerare și alte entități clinice.

Pentru a discuta diagnosticul de laborator în infecțiile produse de streptococii piogeni vom alege **faringita streptococică.** În vederea confirmării unei boli poststreptococice vom discuta reacția ASLO (vezi și capitolul 19).

Diagnosticul de laborator bacteriologic, direct, în faringita streptococică.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic, **secreția purulentă de la nivelul faringelui,** trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid și corect din punct de vedere

al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie, recoltarea se face preferabil dimineaţa înainte ca pacientul să mănânce şi fără să se fi spălat pe dinţi, fără să fi utilizat gargarisme cu diferite soluţii, iar dacă aceste condiţii nu au fost respectate, recoltarea se va face după minim 4 ore etc vezi şi capitolul 6). Produsul recoltat trebuie prelucrat cât mai repede posibil, însă în nici un caz nu trebuie să treacă mai mult de 2-3 ore de la recoltare până la cultivare (preferabil 1-2 ore). În cazul în care se estimează depăşirea acestui interval de timp trebuie folosit un mediu de transport, ex. mediul Stuart (vezi şi capitolul 9). Chiar şi în această situaţie, nu ar trebui să treacă mai mult de 24 de ore până la prelucrarea p.p.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie şi se notează prezenţa **celulelor** de la nivel faringian, prezenţa **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite, piocite) şi prezenţa **cocilor gram-pozitivi** aşezaţi separat, în perechi sau în lanţuri, dar şi a altor tipuri de microorganisme. Examenul microscopic al p.p. are doar un rol orientativ.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Streptococii piogeni sunt **germeni pretenţioşi** care nu se dezvoltă pe medii de cultură obişnuite. Mediul cel mai frecvent folosit este agar-sânge, pe care cultura apare în 18-48 ore, la 35-37°C. În cazul în care nu remarcăm apariţia de colonii caracteristice după 24 de ore, reincubăm placa Petri pentru încă o zi. Coloniile au aspect **de tip S** cu diametrul de **0,5-1 mm, înconjurate de o zonă de β-hemoliză** (zonă clară de hemoliză, cu un diametru mult mai mare decât diametrul coloniei). În cursul însămânţării, pe cel puţin una dintre laturile „poligonului" descris trebuie să realizăm şi o înţepare a mediului în aşa fel încât inoculul să ajungă mai în profunzime. Această manevră (există şi alte variante tehnice) este necesară pentru a permite activitatea hemolizinei O (această streptolizină este inactivată în prezenţa oxigenului). Speciile care produc material capsular, din acid hialuronic, adeseori dau naştere unor colonii mucoide (de tip M). Se pot folosi pentru cultivare şi medii selective (de ex. agar-sânge plus trimetoprim-sulfametoxazol).

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt coci gram-pozitivi, sferici sau ovoidali, cu diametrul de circa 1μm. Se divid într-un plan perpendicular pe axa lor lungă şi se pot dispune în lanţuri. Lungimea lanţurilor variază şi este condiţionată de factorii de mediu.
- Caractere de cultură: Produc colonii de **tip S** cu diametrul de **0,5-1 mm, înconjurate de o zonă de β-hemoliză** sau colonii de tip M.
- Caractere biochimice:
  - Streptococii piogeni produc hemoliză de tip beta.
  - Prin testul PYR este identificată sinteza pirolidonil-amidazei (actualmente există şi teste comerciale, rapide, pentru testul PYR).
  - Multiplicarea streptococilor de grup A este inhibată de bacitracină (antibiotic produs de *Bacillus licheniformis).* Se apreciază că dintre tulpinile de *Streptococcus pyogenes,* mai puţin de 1% sunt rezistente la bacitracină (vezi capitolul 12).

- Streptococii piogeni sunt rezistenţi la trimetoprim-sulfametoxazol.

- Caractere antigenice:
  - Se pot utiliza teste comerciale pentru detectarea rapidă a polizaharidului specific de grup A al streptococilor piogeni în p.p., după extracţie chimică sau enzimatică (ex. cu pronază). Tehnicile utilizate pot fi aglutinarea indirectă (latexaglutinare), coaglutinarea sau ELISA.
  - Prin reacţii de aglutinare (latexaglutinare, coaglutinare) pe lamă, sau precipitare se pot determina antigenele streptococice de grup (Lancefield) sau de tip.
  - *S. pyogenes* este împărţit în serotipuri pe baza antigenelor proteice M (peste 80) prin reacţia de precipitare în tuburi capilare şi T (28 serotipuri) prin reacţia de aglutinare pe lamă. Aceste testări se fac în centre de referinţă.
- Alte teste utilizate în identificare: Se pot utiliza sondele nucleotidice pentru detectarea directă a streptococilor de grup A în exsudatul faringian.

5. Streptococii piogeni îşi menţin sensibilitatea cunoscută la penicilină (au fost identificate în ultima perioadă tulpini "tolerante", care sunt inhibate dar nu distruse de către penicilină). Pentru pacienţii alergici la beta-lactamine se poate alege pentru tratament eritromicina, dar au fost identificate tulpini rezistente la acest medicament antimicrobian şi în acest caz antibiograma devine necesară. În general antibiograma se realizează în scop epidemiologic.

Diagnosticul de laborator serologic

Diagnosticul imunologic al infecţiilor produse de streptococii β-hemolitici din grupul A ar putea consta din investigarea fie a răspunsului imun umoral (prezenţa şi titrul anticorpilor, în cadrul diagnosticului serologic), fie a răspunsului imun de tip celular. În continuare nu vom discuta decât diagnosticul **serologic**, care are importanţă practică.

Diagnosticul serologic este util pentru certificarea etiologiei bolilor poststreptococice (RAA, GNA), identificarea unei eventuale stări de hipersensibilitate, diagnosticul retrospectiv al unei infecţii streptococice, evaluarea evoluţiei clinice şi eficacităţii tratamentului. Diagnosticul serologic se realizează de obicei prin reacţia ASLO, care identifică titruri ale anticorpilor anti-streptolizină O (vezi şi capitolul 19). Testarea se face în dinamică, pe seruri recoltate la interval de 7–10 zile. Pentru zona noastră geografică se acceptă ca normal un titru de 200 (maxim 250) unităţi ASLO. Este strict necesară realizarea controlului intern şi extern de calitate.

Există teste serologice pentru determinarea prezenţei şi titrului anticorpilor faţă de alte structuri antigenice (streptodornază, hialuronidază, streptokinază). Titrul anticorpilor antistreptodornază este crescut la pacienţii cu infecţii tegumentare şi trebuie investigat dacă se suspicionează prezenţa unei glomerulonefrite acute. Se pot determina şi anticorpii anticarbohidrat (hemaglutinare pasivă) sau anti-MAP (prin latex aglutinare).

26. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Streptococcus pneumoniae se prezintă sub formă de coci gram-pozitivi, alungiți, lanceolați, dispuși în general în diplo pe axul longitudinal, încapsulați, nesporulați, imobili. Pneumococii sunt aerobi, facultativ anaerobi. Pe geloză-sânge determină α-hemoliză la fel ca *Streptococcus viridans*. Creșterea lor este favorizată în atmosferă de 5% CO_2 la o temperatură de 37°C. *Streptococcus pneumoniae* poate deveni patogen prin multiplicare și invazivitate, conducând la apariția unor variate infecții ale tractului respirator superior și inferior, ale urechii medii, ale sinusurilor, dar și alte infecții produse prin diseminare hematogenă (ex. meningită, endocardită, care pot fi foarte grave). **Pneumonia pneumococică** se însoțește de prezența edemului alveolar și a unui exsudat fibrinos, urmat de apariția de hematii și leucocite.

Datorită faptului că poate face parte din flora microbiană normală, există o serie de probleme în ceea ce privește interpretarea semnificației prezenței pneumococilor în produse patologice care pot fi contaminate cu această floră (ex. sputa recoltată prin expectorație). Una dintre marile probleme terapeutice decurgând din **dezvoltarea rezistenței la antibiotice** o reprezintă apariția pneumococilor rezistenți la penicilină și alte medicamente antibacteriene.

Pentru a discuta diagnosticul de laborator în infecțiile produse de pneumococi vom alege drept entitate reprezentativă pneumonia pneumococică. Diagnosticul pneumoniei pneumococice este adeseori clinic și radiologic.

Diagnosticul de laborator microbiologic este numai bacteriologic (direct)

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid și corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie și antisepsie etc). În funcție de maladia provocată se pot recolta următoarele produse patologice: spută, aspirat bronșic sau traheal, exsudat faringian, secreții otice sau conjunctivale, lichid pleural, lichid pericardic, LCR, puroi, sânge, material necroptic. În pneumonia pneumococică agentul etiologic poate fi izolat și prin hemocultură. În continuare vom discuta cazul în care p.p. este reprezentat de **spută** (vezi și capitolul 6).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat și transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) și respectiv Gram. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie și se notează prezența **celulelor** de la nivel alveolar (ex. macrofage alveolare), prezența **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite) și prezența **cocilor gram-pozitivi,** alungiți, lanceolați, dispuși în general în diplo, încapsulați (cu o capsulă comună), nesporulați. Examinarea microscopică trebuie să demonstreze **calitatea produsului patologic** și să realizeze o identificare prezumtivă a microorganismului implicat (vezi și capitolul 52). În colorația cu albastru de

metilen, capsula poate apărea ca un halou în jurul pneumococilor. Utilizând anticorpi anticapsulari, se poate realiza o identificare rapidă inclusiv direct, pe produsul patologic (de exemplu spută), prin **reacţia de umflare a capsulei** (vezi capitolul 12, punctul 12.14).

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Pneumococii sunt germeni pretenţioşi, care nu se dezvoltă pe medii simple, sunt aerobi, facultativ anaerobi. Pe geloză-sânge formează colonii de tip S sau de tip M, înconjurate de o zonă de α-hemoliză (la fel ca *Streptococcus viridans).* Multiplicarea este favorizată în atmosferă de 5% CO_2 la o temperatură de 35-37°C. În mediile de cultură lichide tulbură omogen mediul.

Produsul patologic se poate inocula şi la animale de laborator sensibile, respectiv la şoareci albi.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt coci gram-pozitivi, alungiţi, lanceolaţi, dispuşi în general în diplo, încapsulaţi (cu o capsulă comună), nesporulaţi.
- Caractere de cultură: Pe geloză-sânge formează colonii de tip S sau M, înconjurate de o zonă de **α-hemoliză** (la fel ca *Streptococcus viridans).*
- Caractere biochimice:
  - Glucoza reprezintă principala sursă de energie pentru pneumococi (aceştia elaborează enzime zaharolitice, proteolitice şi lipolitice).
  - **Fermentarea inulinei** reprezintă un caracter biochimic important, util în diferenţierea pneumococilor de *S. viridans* (există tulpini de *S. viridans* care fermentează inulina). Se utilizează un mediu în care există inulină şi un indicator de pH. În cazul reacţiei pozitive are loc o modificare de pH şi respectiv modificarea culorii mediului.
  - Pneumococii elaborează enzime autolitice. Autoliza este indusă şi accelerată de bilă, săruri biliare, acizi biliari; testul este util în identificarea pneumococilor (**testul bilolizei,** Neufeld; vezi capitolul 12, punctul 12.3).
  - Sunt sensibili la optochin (etil-hidrocupreină), sensibilitatea la această substanţă fiind de asemenea utilă în identificare şi diferenţierea de *Streptococcus viridans* (vezi capitolul 12, punctul 12.13).
- Caractere antigenice:
  - Cel mai important determinant antigenic şi patogenic este capsula polizaharidică (antigenul K), ce protejează pneumococul faţă de fagocitoză şi permite invazivitatea. Structura polizaharidului capsular este specifică fiecărui serotip în parte. Până în prezent au fost identificate peste 85 de serotipuri capsulare diferite, a căror structură a fost determinată pentru majoritatea serotipurilor. Au fost produse seruri specifice anticapsulare polivalente şi monovalente, utile în identificarea pneumococilor cu ajutorul reacţiei de umflare a capsulei (vezi capitolul 12, punctul 12. 14). În acelaşi scop se poate utiliza şi reacţia de aglutinare.

- Datorită faptului că prin urină se elimină cantităţi destul de importante de Ag K, prezenţa acestuia poate fi evidenţiată prin reacţii de latexaglutinare sau mai bine prin imunoelectroforeză.
- Caractere de patogenitate: Se poate utiliza inocularea la şoarecele alb (vezi capitolul 11).
- Alte teste utile în identificare: Se pot utiliza sonde nucleotidice pentru identificarea ARNr.

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **este obligatorie** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice pe medii suplimentate cu sânge defibrinat de oaie. Pentru verificarea sensibilităţii/rezistenţei la penicilină se utilizează microcomprimate cu oxacilină (1 μg). În cazul unor infecţii grave antibiograma trebuie să fie însoţită de alte determinări (vezi capitolul 14).

27. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *NEISSERIA*

Familia *Neisseriaceae* include mai multe genuri, spre exemplu *Neisseria, Moraxella, Acinetobacter, Kingella.* În genul *Neisseria,* speciile importante pentru patologia umană sunt *Neisseria meningitidis* (meningococul) și *Neisseria gonorrhoeae* (gonococul), dar se pot aminti și *N. lactamica, N. sicca, N. subflava* etc. În acest capitol vom discuta numai diagnosticul de laborator în infecțiile produse de meningococ și gonococ.

Neisseriile se prezintă sub formă de coci gram-negativi, dispuși în diplo, reniformi, imobili, înconjurați de o structură capsulară comună. În funcție de structura capsulei există mai multe serogrupuri. Ambele microorganisme sunt oxidazo pozitive și au nevoie în vederea izolării de medii de cultură îmbogățite, necesitățile nutritive fiind mai mari în cazul gonococului. Principial se pot multiplica pe mediul Mueller-Hinton (amintit și la antibiograma difuzimetrică) după ce izolarea din p.p. a fost realizată pe alte medii îmbogățite. Multiplicarea are loc la o temperatură de incubare de 35-37°C și în condițiile unei atmosfere de 3-10% CO_2. Coloniile apar în 24-48 de ore, mai rapid în cazul meningococului.

Neisseria meningitidis

Neisseria meningitidis poate face parte din flora microbiană de la nivel oral, nazal sau faringian. Colonizarea poate persista săptămâni sau luni de zile. Meningococul este un microorganism condiționat patogen care poate fi implicat în infecții respiratorii, dar este semnificativ de reținut faptul că prin invazivitate poate conduce la apariția unei bacteriemii în cursul căreia complicația principală este **meningita meningococică.** Meningococul reprezintă una din primele trei cauze de meningită infecțioasă la adulți (alături de *Haemophilus influenzae* și *Streptococcus pneumoniae).*

Diagnosticul meningitei meningococice

Diagnosticul meningitei meningococice pornește de la elementele clinice, eventual într-un anume context epidemiologic; din punct de vedere al stabilirii etiologiei este un diagnostic bacteriologic (direct).

Diagnosticul de laborator

În **meningita meningococică** diagnosticul este **urgent** (risc de evoluție cu sechele și/sau deces), de importanță maximă fiind recoltarea și transportul rapid al LCR către laborator. Este de preferat realizarea unei cultivări „la patul bolnavului", chiar dacă pentru concentrarea germenilor ar putea fi necesară centrifugarea LCR. Analiza citologică și biochimică a LCR este utilă în stabilirea etiologiei.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid și corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate

normele de asepsie şi antisepsie etc). Aşa cum am menţionat, **recoltarea LCR** prin puncţie (după verificarea presiunii din artera centrală a retinei prin examinarea fundului de ochi) trebuie făcută pe cât posibil la patul bolnavului, având la dispoziţie tot ce este necesar pentru pregătirea frotiurilor, cultivarea pe diferite medii de cultură, repartizarea unei cantităţi de LCR pentru examenul citologic şi biochimic (vezi şi capitolul 6). LCR poate fi purulent. În cazul în care p.p. urmează a fi transportat către laborator, transportul trebuie realizat fără întârziere (la o temperatură apropiată de 37°C). Meningococul ar putea fi izolat şi prin hemocultură, cultivarea secreţiilor nazale sau faringiene etc.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Dacă LCR este franc purulent frotiurile se pot executa direct din p.p., în caz contrar realizăm iniţial centrifugarea LCR. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie şi se notează prezenţa **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite) şi prezenţa **cocilor gram-negativi,** dispuşi în diplo, reniformi, imobili, înconjuraţi de o structură capsulară comună, situaţi intra sau extraleucocitar.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Meningococii sunt germeni pretenţioşi, care nu se dezvoltă pe medii simple, sunt aerobi, facultativ anaerobi. Se pot utiliza medii selective (ex. medii în care se include vancomicină, colistin, trimetoprim şi nistatin) sau neselective (ex. Mueller-Hinton, geloză-sânge sau geloză-chocolat) pe care formează colonii de tip S sau de tip M. Este necesară o atmosferă de 3-5% CO_2, la o temperatură de 37°C.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt coci gram-negativi, dispuşi în diplo, reniformi, imobili, înconjuraţi de o structură capsulară comună, nesporulaţi.
- Caractere de cultură: Coloniile de meningococ sunt de tip S, cu dimensiuni de circa 1-2 mm. Tulpinile încapsulate (ex. grupele A, C) pot conduce la apariţia unor colonii de tip M.
- Caractere biochimice:
  - Metabolizează diferiţi carbohidraţi, activitate care poate fi utilă în identificare. Spre exemplu meningococul metabolizează atât glucoza cât şi maltoza.
  - Produc citocrom-oxidază, un test cheie în identificare (vezi şi capitolul 12)
  - Există o serie de sisteme comerciale pentru identificare exoenzimatică a Neisseriilor (ex. API, Quad Ferm+, RIM, Minitek etc).
- Caractere antigenice: În funcţie de structura lipooligozaharidului există 12 serotipuri. Cel mai important determinant antigenic este capsula polizaharidică. Structura capsulară permite subdivizarea speciei în 13 serogrupuri. Dintre acestea mai importante sunt grupele: A, B, C, Y şi W-135.
  - Prezenţa meningococului poate fi detectată direct în **produsul patologic** prin latex aglutinare, coaglutinare sau contraimunoelectroforeză utilizând seruri polivalente anti-A, C, Y, W-135 şi respectiv seruri monovalente anti-B (se pot detecta 0,02-

0,05 μg de Ag/ml). De notat posibilitatea unei reactivităţi încrucişate faţă de Ag grupului B, respectiv Ag K1 de la *E. coli*.

- Tehnici similare se pot utiliza pentru identificarea tulpinilor de meningococ izolate în cultură.
- Caractere utilizate în tiparea tulpinilor izolate: Există diferite tehnici (imunologice, electroforetice, de biologie moleculară) care sunt practicate numai în centre de referinţă. Utilizarea PCR are o sensibilitate şi specificitate de circa 91%; foarte utilă la pacienţii pentru care s-a iniţiat deja antibioticoterapia.

5. Antibiograma (testarea sensibilităţii tulpinilor izolate în vederea stabilirii tratamentului) **este recomandată** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice. În cazul unor infecţii grave antibiograma trebuie să fie însoţită de alte determinări (vezi capitolul 14).

Neisseria gonorrhoeae

Infecţiile gonococice continuă să reprezinte o problemă importantă de sănătate publică.

După pătrunderea în organismul receptiv, în funcţie de calea de transmitere, gonococul se ataşează de mucoase (genito-urinară, oculară, rectală, faringiană etc) şi produce local o supuraţie acută. La bărbaţi apare uretrita gonococică. La femei, gonoreea se localizează endocervical, dar se poate extinde la nivelul uretrei, vaginului, glandelor Bartholin, trompelor uterine. Dacă mama are gonoree şi nou-născutul se naşte pe cale naturală, poate apărea oftalmia gonococică. Rareori gonococul poate disemina pe cale sanguină (bacteriemie), cu apariţia unor leziuni dermice, artrite, tenosinovite gonococice etc.

Diagnosticul de laborator în gonoree

Diagnosticul de laborator este numai **bacteriologic (direct)**.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie etc). La bărbat se prelevează **secreţia uretrală** (eventual „picătura matinală"), iar la femeie recoltarea trebuie efectuată pe masă ginecologică **de la nivelul colului uterin** şi glandelor Bartholin (vezi şi capitolul 6). Secreţiile au de obicei un aspect purulent. Este de preferat cultivarea **imediat**, pe medii de cultură potrivite şi **în atmosferă de CO_2**. În cazul în care p.p. urmează a fi transportat către laborator, transportul trebuie realizat fără întârziere (la o temperatură apropiată de 37°C). Chiar şi în cazul utilizării mediilor de transport (ex. mediul Amies plus cărbune activat), acesta nu ar trebui să dureze mai mult de 6 ore. Gonococul ar putea fi izolat şi prin hemocultură, cultivarea secreţiilor conjunctivale, faringiene, cultivarea urinei etc. În cazul în care nu există nici o secreţie, se poate utiliza urina care trebuie centrifugată şi însămânţată **imediat** pe medii de cultură.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie şi se notează prezenţa celulelor, a **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite) şi

prezenţa **cocilor gram-negativi,** dispuşi în diplo, reniformi, imobili, înconjuraţi de o structură capsulară comună, situaţi intra sau extraleucocitar.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Gonococii sunt germeni foarte pretenţioşi, care nu se dezvoltă pe medii simple, sunt aerobi, facultativ anaerobi. Se pot utiliza medii selective (ex. medii în care se include vancomicină, colistin, trimetoprim şi nistatin) sau neselective (ex. mediul GC, geloză-sânge sau geloză-chocolat cu diferite suplimente nutritive; se recomandă utilizarea pulberii de hemoglobină şi nu a sângelui proaspăt). Este preferată cultivarea „în dublu", pe medii selective şi neselective; în cazul în care p.p. este reprezentat de secreţie de la nivelul rectului sau de secreţie faringiană se vor folosi numai medii selective. Este necesară o atmosferă de 3-10% CO_2, la o temperatură de 35-37°C. Coloniile apar în 24-48 de ore. Gonococul produce colonii de tip S, cu dimensiuni de 0,5-1 mm sau colonii de tip M, nepigmentate, transparente sau opace. Este de remarcat faptul că în aceeaşi placă pot apărea până la cinci tipuri de colonii (T1-T5). Placa este eliminată în cazul în care nu se dezvoltă colonii, după 72 de ore.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt coci gram-negativi, dispuşi în diplo, reniformi, imobili, eventual înconjuraţi de o structură capsulară comună, nesporulaţi. Se poate utiliza şi „coloraţia" fluorescentă.
- Caractere de cultură: Coloniile de gonococ sunt de tip S sau M (vezi punctul 3).
- Caractere biochimice:
  - Metabolizează diferiţi carbohidraţi, activitate care poate fi utilă în identificare. Gonococul metabolizează glucoza dar nu şi maltoza.
  - Produc citocrom-oxidază, un test cheie în identificare (vezi şi capitolul 12).
  - Testul catalazei (superoxol) este intens pozitiv.
  - Există o serie de sisteme comerciale pentru identificare exoenzimatică a *Neisseriilor* (ex. API, Quad Ferm+, RIM, Minitek, Gonochek II etc).
  - Utilizând galeria API NH (manuală) putem identifica specii de *Neisseria, Haemophilus* şi *Branhamella catarrhalis,* în numai 4 ore.
- Caractere antigenice:
  - În funcţie de structura lipooligozaharidului există 6 serotipuri. Gonococii pot exprima simultan mai multe structuri antigenic diferite, ceea ce crează probleme tehnice. Aceste testări se realizează în centre de referinţă.
  - Prezenţa gonococului poate fi detectată direct **în produsul patologic** prin coaglutinare (suspensie de *S. aureus* tip Cowan I stabilizată şi sensibilizată cu Ac monoclonali antiproteină I din membrana externă a gonococilor) sau printr-o tehnică imunoenzimatică (cu Ac policlonali).
  - Se pot utiliza Ac monoclonali cunoscuţi, pentru identificare gonococului prin tehnica imunofluorescenţei directe.

- Metodele biologiei moleculare au atât o specificitate cât şi o sensibilitate foarte bună; se pot utiliza fie pornind de la culturi fie de la p.p.
  - Sondele nucleotidice
  - PCR
  - LCR (Ligase Chain Reaction); această metodă se poate utiliza pornind de la urină sau de la secreţii vaginale şi are un singur dezavantaj, costul ridicat.

5. Antibiograma (testarea sensibilităţii tulpinilor izolate în vederea stabilirii tratamentului) **este recomandată** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice (mediul utilizat este GC suplimentat nutritiv dar fără pulbere de hemoglobină). Au fost identificate tulpini rezistente la penicilină (fie datorită unui plasmid care codifică o β-lactamază de tipul TEM, fie datorită unor mutaţii cromozomiale). Este necesară testarea producerii de β-lactamază (de ex. folosind discuri cu nitrocefin). Determinarea CMI se poate realiza prin metode clasice sau cu ajutorul testului E (vezi capitolul 14).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

28. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE ENTEROBACTERII

Familia *Enterobacteriaceae* cuprinde un important număr de genuri de microorganisme semnificative din punct de vedere medical (28) și numeroase specii (peste 100, în cazul în care nu luăm în considerare clasificarea genului *Salmonella* în peste 2000 de specii). Dintre genurile incluse în această vastă familie, vom aminti următoarele: *Escherichia, Shigella, Salmonella, Yersinia, Klebsiella, Proteus, Citrobacter, Edwarsiella, Enterobacter, Morganella, Providencia* și *Serratia*. În capitolele următoare vom discuta numai despre diagnosticul în infecțiile produse de microorganismele aparținând primelor 6 genuri enumerate. Enterobacteriile sunt bacili gram negativi care nu se pot diferenția prin microscopie optică, mobili cu cili peritrichi (ex. *Salmonella spp., Proteus spp.),* sau imobili (ex. *Shigella, Yersinia, Klebsiella),* nesporulați; unele specii prezintă capsulă (ex. *Klebsiella pneumoniae).*

Sunt germeni nepretențioși care se pot multiplica pe medii simple, aerobi facultativ anaerobi, utilizează fermentativ glucoza cu sau fără producere de gaz, sunt oxidazo-negativi, catalazo-pozitivi, reduc nitrații. Formează colonii de tip S, R (în cazul culturilor „vechi") sau M (pentru speciile capsulate), pot fermenta lactoza (ex. *Escherichia coli, Klebsiella)* sau sunt lactozo negativi (ex. *Salmonella, Shigella, Yersinia).* Pentru izolarea speciilor de enterobacterii putem folosi medii selective, diferențiale și selectivo-diferențiale. Există medii cu selectivitate mai redusă care inhibă majoritatea bacteriilor gram pozitive și permite dezvoltarea tuturor enterobacteriilor (ex. mediul Mac Conkey cu săruri biliare în concentrație mică; se poate adăuga și cristal violet), medii cu selectivitate medie care inhibă multiplicarea enterobacteriilor lactozo-pozitive (ex. mediul ADCL cu dezoxicolat, citrat și lactoză, mediul *Shigella-Salmonella* cu săruri biliare și verde briliant sau mediul XLD cu xiloză, lizină și dezoxicolat, preferat în multe dintre țările Uniunii Europene) și medii cu selectivitate înaltă (ex. mediul Wilson-Blair cu verde briliant în concentrație crescută).

Caracterele biochimice **sunt esențiale** pentru identificarea enterobacteriilor. După examinarea caracterelor de cultură (pe mediile selectivo-diferențiale se poate identifica și comportamentul în ceea ce privește fermentarea lactozei), prin repicarea coloniilor suspecte pe medii potrivite (TSI, MIU/MILF, Simmons etc), în ziua următoare se pot examina diferite caractere biochimice (fermentarea zaharurilor, evidențierea unui anumit metabolit, metabolizarea unui anumit substrat, utilizarea citratului ca unică sursă de carbon, identificarea unor enzime etc) sau alte caractere fenotipice (ex. motilitatea). În momentul de față există baterii de teste și sisteme comerciale care permit examinarea unei game extinse de caractere biochimice (ex. galeriile API). Dorim să menționăm că pentru fiecare test fenotipic există o serie de variații care sunt prezentate procentual în tabele special dedicate.

Un alt aspect foarte util pentru identificare este reprezentat de studierea caracterelor antigenice folosind seruri cunoscute (preparate pe animale de laborator), cu ajutorul diferitelor reacții Ag-Ac (vezi și capitolele 15-20). Toate enterobacteriile dețin Ag O. Enterobacteriile mobile dețin Ag H. Enterobacteriile capsulate dețin Ag K. *Salmonella typhi* prezintă și Ag Vi, *Yersinia* pestis prezintă Ag F1 etc.

Infecţiile enterobacteriene sunt destul de variate. Pot fi localizate la nivel digestiv (dizenterie şi sindroame asemănătoare dizenteriei, sindroame asemănătoare holerei, toxi-infecţii alimentare etc), la nivelul tractului urinar, la nivelul aparatului respirator sau la nivelul sistemului nervos. Infecţiile enterobacteriene pot avea şi alte localizări sau pot fi generalizate (de ex. în febra tifoidă, febrele paratifoide, pestă).

În majoritatea infecţiilor produse de enterobacterii diagnosticul este bacteriologic, direct. În febra tifoidă diagnosticul poate fi atât bacteriologic cât şi imunologic (serologic). Datorită faptului că în multe dintre aceste infecţii produsul patologic este reprezentat de către materiile fecale, în continuare vom discuta examenul bacteriologic al materiilor fecale.

COPROCULTURA

În multe dintre infecţiile produse de enterobacterii, care se manifestă prin sindrom diareic, utilizăm coprocultura. În cele ce urmează vom discuta coprocultura în general, nu numai din punctul de vedere al unei infecţii enterobacteriene.

Boala diareică acută

Boala diareică acută (BDA) a fost şi rămâne o entitate patologică foarte răspândită la nivel mondial. Spre exemplu, în ţara noastră în ultimii ani, numărul de cazuri de boli diareice acute a fost de 85.055 în anul 2000, 81.268 în anul 2001 şi respectiv 97.317 în anul 2002, cu o incidenţă de 446,5 $^{0}/_{0000}$ în 2002. În aceeaşi perioadă de timp, în fiecare an au decedat datorită BDA circa 100 de pacienţi.

Sindromul diareic include eliminarea a peste 3 scaune în 24 de ore iar scaunele au consistenţa diminuată (până la emiterea unor scaune apoase, cu pierderea a până la 20-30 litri/zi în holeră). Materiile fecale pot avea aspect patologic (apos, mucos, purulent, sanguinolent etc), culoare modificată, miros particular etc. De regulă sindromul diareic asociază şi alte semne şi simptome digestive (dureri abdominale, teesme, greaţă, vărsături etc) sau generale (febră, stare generală alterată etc). Foarte important şi obligatoriu de reţinut este că BDA duce la pierderi de apă şi electroliţi iar intervenţia cea mai importantă care trebuie avută în vedere este reechilibrarea hidroelectrolitică.

Agenţi etiologici

Boala diareică acută poate fi de etiologie infecţioasă şi neinfecţioasă. În continuare vom discuta pe scurt etiologia infecţioasă în general, nu numai cea bacteriană sau fungică. Este de menţionat că marea majoritate a BDA infecţioase au etiologie virală.

Etiologia bacteriană include

- *Salmonella spp.*
- *Shigella spp.*
- *Escherichia coli* (EPEC/enteropatogen, ETEC/enterotoxigen, EHEC/enterohemoragic, EIEC/enteroinvaziv, EAEC/enteroagregant, DAEC/aderent difuz)
- *Klebsiella spp.*
- alte enterobacterii (*Yersinia enterocolitica, Citrobacter spp., Proteus spp.* etc)
- *Vibrio cholerae* şi alţi vibrioni

- alţi bacili gram negativi (*Aeromonas spp., Alcaligenes spp., Pseudomonas spp.* etc)
- *Bacillus cereus*
- *Campylobacter jejuni*
- *Clostridium perfringens, Clostridium difficile*
- *Clostridium botulinum*
- *Staphylococcus aureus* etc

Etiologia fungică include

- *Candida albicans* (la pacienţi cu SIDA) etc.

Etiologia parazitară include

- *Giardia lamblia*
- *Entamoeba hystolitica* şi *Entamoeba coli*
- *Trichinella spiralis*
- *Cryptosporidium parvum*
- *Strongyloides stercoralis* etc.

Etiologia virală include

- rotavirusurile
- virusurile Norwalk şi asemănătoare virusurilor Norwalk
- calicivirusurile
- astrovirusurile
- coronavirusurile
- enterovirusurile
- adenovirusurile etc.

Gruparea agenţilor etiologici în funcţie de mecanismul patogenic

Atât din punct de vedere diagnostic cât şi pentru tratament poate fi importantă elucidarea tipului de mecanism implicat. Astfel, BDA ar putea fi produse prin:

- mecanism neinflamator, atunci când din punct de vedere microscopic în preparatul între lamă şi lamelă nu se evidenţiază leucocite (ex. BDA produse de *Vibrio cholerae*, ETEC, *Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Giardia lamblia*, rotavirusuri, virusuri Norwalk, *Cryptosporidium parvum* etc)
- mecanism inflamator, atunci când din punct de vedere microscopic în preparatul între lamă şi lamelă se evidenţiază leucocite polimorfonucleare (ex. BDA produse de *Shigella spp.*, EIEC, *Salmonella enteritidis, Vibrio parahaemolyticum, Entamoeba hystolitica* etc)
- mecanism de „penetrare", atunci când din punct de vedere microscopic în preparatul între lamă şi lamelă se evidenţiază leucocite mononucleare (ex. BDA sau sindrom diareic produs de *Salmonella typhi, Yersinia enterocolitica* etc).

După cum se poate remarca, simpla recoltare a produsului patologic urmată de realizarea unui preparat nativ (vezi capitolul 7) şi examinarea microscopică a acestuia pot da informaţii importante cu privire la etiologia probabilă precum şi atitudinea terapeutică de urmat. Este evident că într-o BDA pentru care agenţii etiologici sunt virali sau mecanismul patogenic

include acţiunea unei toxine **este contraindicată** administrarea de antibiotice sau chimioterapice antibacteriene.

Indicaţiile coproculturii în bacteriologie

- atunci când este suspicionată o infecţie cu *Shigella spp., Vibrio cholerae, E. coli* (tipurile patogene), *Campylobacter spp., Yersinia enterocolitica* sau *Salmonella spp.* în special la pacienţi cu vârste extreme sau imunodepresie
- după circa 1 săptămână de la debutul febrei tifoide etc
- atunci când BDA prezintă riscul extinderii la nivelul unei colectivităţi (creşe, grădiniţe, tabere, unităţi de alimentaţie publică, staţii de distribuţie a apei potabile etc)
- atunci când BDA apare la pacienţi care au fost trataţi cu antibiotice iar sindromul diareic persistă şi după întreruperea antibioticoterapiei
- atunci când sindromul diareic persistă mai mult de o săptămână sau are loc o recădere
- în scopul verificării stării de sănătate a persoanelor care lucrează în unităţi de alimentaţie publică (conform normativelor stabilite de către ministerul sănătăţii)
- în scop de cercetare etc.

Recoltarea şi transportul materiilor fecale

Se vor respecta recomandările menţionate în capitolul 6, în special faptul că recoltarea p.p. trebuie să se realizeze înainte de administrarea de medicamente antimicrobiene. Se pot recolta şi examina:

- scaunul emis spontan care reprezintă p.p. utilizat cel mai frecvent. Defecaţia are loc într-un recipient de carton sau într-un container din material plastic de unică întrebuinţare (care poate fi apoi decontaminat şi eliminat fără probleme). În acelaşi timp efectuăm şi examinarea macroscopică a p.p. din punctul de vedere al mirosului, culorii sau aspectului. Utilizăm pentru prelevare linguriţa recoltorului alegând porţiuni care permit cu o mai mare şansă izolarea agentului patogen (fragmente mucopurulente, porţiuni cu sânge, flocoane riziforme etc) sau porţiuni diferite dintr-un scaun în care nu se remarcă aspectele menţionate anterior. Prelevăm o cantitate de aproximativ 1 gram pe care o suspensionăm în mediul de transport (minim 2 ml în cazul scaunelor apoase).
- tamponul rectal este recomandat în cazul unei infecţii cronice cu *Shigella spp.*, atunci când suspicionăm portajul de *Shigella spp.* sau *Salmonella spp.* Tamponul steril se introduce cu blândeţe şi se prelevează secreţiile de la nivelul mucoasei rectale, prin rotire, pentru a recolta material din criptele rectale. Apoi introducem, tamponul în mediul de transport. Pentru a putea închide recoltorul, tăiem în mod corespunzător tija tamponului.
- sonda Nelaton se poate utiliza atunci când urmărim recoltarea p.p. de la nivelul colonului sigmoid. Introducem cu blândeţe sonda până la nivelul dorit (circa 10-12 cm la copil şi respectiv circa 15-20 cm la adult), adaptăm la celălalt capăt al sondei o seringă şi aspirăm p.p. de la nivel sigmoidian. Introducem p.p. în mediul de transport.

În cazul în care p.p. nu poate fi prelucrat imediat sau în maxim 1 oră, utilizăm un mediu de transport, transportul la rece (+4°C) sau transportul în mediu de transport menţinut la

4°C. Cel mai frecvent utilizăm mediul Cary-Blair (vezi capitolul 9). Acest mediu asigură supravieţuirea enterobacteriilor patogene timp de 24-48 de ore, inhibând în acelaşi timp multiplicarea florei de asociaţie. Atunci când este suspicionată infecţia cu *V. cholerae*, apa peptonată alcalină serveşte în acelaşi timp drept mediu de transport şi mediu de îmbogăţire.

Examinarea materiilor fecale

Materiile fecale sunt examinate macroscopic şi microscopic. Din punct de vedere microscopic, de fiecare dată se vor realiza preparate native (între lamă şi lamelă). Materiile fecale sunt suspensionate într-o picătură de lugol sau de albastru de metilen 1%, iar preparatul se va examina iniţial cu obiectivul 10×, apoi cu obiectivul 40×. Spre exemplu, evidenţierea a peste 40 PMN/câmp, însoţite de macrofage şi hematii, conduce la suspicionarea unei dizenterii bacteriene. Frotiurile colorate pot fi utile în suspicionarea diagnosticului de enterocolită cu *Campylobacter spp.* sau al colitei pseudomembranoase, post antibioticoterapie.

Cultivarea materiilor fecale

În mod obişnuit, pentru cultivare vom utiliza 3 medii diferite, respectiv o eprubetă cu bulion selenit acid de sodiu şi 2 plăci Petri, una cu mediu cu selectivitate scăzută (ex. Mac Conkey) şi alta cu mediu cu selectivitate medie (ex. ADCL sau XLD). Aceste medii selective sunt în acelaşi timp şi medii diferenţiale.

Alegem fragmente caracteristice din p.p. (mucus, puroi etc) şi însămânţăm 2-3 anse în mediul cu bulion selenit (mediu de îmbogăţire în special pentru *Salmonella spp.*). Realizăm o suspensie omogenă în mediul lichid. Prelevăm o ansă (sau o picătură) din suspensie şi o depunem pe mediul MacConkey. Modul de însămânţare diferă de cel prezentat în capitolul 10. Întindem p.p. în striuri paralele pe o jumătate de placă, până aproape de marginile plăcii fără să le atingem. Fără să sterilizăm ansa, atingem ultimile 3-4 striuri şi dispersăm p.p. în alte striuri paralele, perpendiculare pe primele, pe jumătate din mediul disponibil, până aproape de marginile plăcii, fără să le atingem. Atingând din nou ultimele 3-4 striuri, dispersăm p.p. în mod similar pe mediul încă neînsămânţat. Incubăm timp de 18-24 de ore la 35-37°C.

În ziua următoare examinăm plăcile însămânţate precedent în vederea selectării coloniilor suspecte. Apoi, pornind de la tubul cu bulion selenit însămânţăm aşa cum am menţionat mai sus o placă cu MacConkey şi o placă cu ADCL (sau XLD); incubăm aceste plăci timp de 18-24 de ore la 35-37°C.

Pe mediul MacConkey coloniile lactozo-pozitive au dimensiuni de 1-3 mm, sunt roşii, pot prezenta un halou opalescent, de regulă sunt de tip S dar pot fi şi de tip M. Coloniile lactozo-negative au dimensiuni de 1-2 mm, nu sunt colorate, sunt transparente, de regulă sunt de tip S.

Pe mediul ADCL majoritatea bacteriilor lactozo-pozitive sunt inhibate; pot apărea tardiv colonii de dimensiuni mai mici, roşii, de tip S. Coloniile lactozo-negative au dimensiuni de 1-2 mm, nu sunt colorate, sunt semitransparente, de tip S; dacă produc H_2S centrul coloniei este de culoare neagră.

De regulă urmărim apariţia coloniilor lactozo-negative, iar pentru etapele de identificare vom repica (fără a atinge mediul de cultură) 3 colonii în cazul în care pacientul este copil şi

3-5 colonii în cazul în care pacientul este adult. În cazul în care nu există colonii lactozo-negative, pentru identificare vom repica (fără să atingem mediul de cultură) 10 colonii la copil şi respectiv 10 colonii la adult (dacă se consideră că identificarea este necesară, de ex. în izbucniri epidemice de BDA).

Aşadar, după apariţia coloniilor izolate pe mediile selectivo-diferenţiale trecem la identificarea speciilor implicate patogenic pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură (vezi capitolul 11), biochimice (vezi capitolele 11 şi 12), antigenice (vezi capitolele 11-20, în special capitolul 17), de patogenitate, pe baza sensibilităţii la bacteriofagi şi eventual pe baza unor caractere moleculare. Pentru interpretare vom utiliza diferitele tabele disponibile în tratatele de specialitate sau recomandările producătorilor în cazul utilizării unor sisteme comerciale de diagnostic. Pentru tulpinile considerate a fi implicate patogenic vom realiza studiul sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice, de regulă prin metode difuzimetrice (antibiograma difuzimetrică standardizată, comparativă, E test).

Alte aspecte particulare urmează a fi prezentate în capitolele următoare.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

29. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE *ESCHERICHIA COLI*

După ce o serie de date sugerau asemănarea din punct de vedere molecular între speciile genurilor *Escherichia* şi *Salmonella,* cunoştinţele actuale pledează pentru o grupare a speciilor din genurile *Escherichia* şi *Shigella.* Cu toate acestea, vom prezenta în continuare separat diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganismele aparţinând genurilor „clasice". Genul *Escherichia* cuprinde germeni comensali care se găsesc ubicvitar (în apă, pe sol, etc) iar la nivelul intestinului uman au rol în sinteza unor vitamine (simbioză). Sunt bacili gram negativi mobili sau imobili, aerobi facultativ anaerobi, lactozo pozitivi. Specia tip este reprezentată de *Escherichia coli.*

Cu toate că majoritatea tulpinilor de *E. coli* sunt saprofite sau condiţionat patogene (fiind implicate în infecţii oportuniste cu localizări în afara tractului digestiv, spre ex. peritonite, colecistite, infecţii ale plăgilor, endometrite, pneumonii etc) există şi anumite tulpini dotate cu caractere patogenice particulare. Dintre aceste tipuri de *E. coli* (patotipuri) se disting trei grupări mai importante:

- tipuri patogene implicate în boli diareice acute (BDA)
  - *E. coli* enteroagregativ (EAggEC) implicat în apariţia unei BDA apoase, persistentă, cu mucus, în special la sugari
  - *E. coli* enterohemoragic (EHEC), spre exemplu serotipul O157:H7, care elaborează două citotoxine şi este implicat în apariţia unei BDA apoasă, care poate deveni severă şi se poate însoţi de o complicaţie gravă, sindromul hemolitic uremic
  - *E. coli* enteroinvaziv (EIEC) care elaborează una sau mai multe enteroxine producând un sindrom dizenteriform
  - *E. coli* enteropatogen (EPEC) care determină diaree la copilul mic, uneori de gravitate maximă (ex. diaree malignă la nou născut)
  - *E. coli* enterotoxigen (ETEC) care elaborează două enterotoxine (termolabilă şi termostabilă) şi produce un sindrom holeriform
  - *E. coli* aderent difuz (DAEC) care produce diaree apoasă, persistentă, la copii în vârstă de 1-5 ani
- tipuri (grupuri) patogene implicate în infecţii ale tractului urinar (ITU)
- tipul patogen implicat în infecţia meningeală la nou născut.

Indiferent de localizarea infecţiei, diagnosticul de laborator microbiologic este bacteriologic, direct.

Diagnosticul de laborator microbiologic în infecţiile cu localizare digestivă

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute. Produsul patologic este reprezentat de obicei de scaunul diareic dar am putea

recolta şi lichid de vărsătură sau un anumit aliment incriminat. Materiile fecale se examinează macroscopic şi se trimit către laborator aşa cum am menţionat în capitolul precedent. În continuare vom discuta diagnosticul unei infecţii produsă de EHEC (ex. O157:H7) dar, subliniem faptul că în practica medicală, pornind de la p.p. reprezentat de materiile fecale, putem izola orice microorganism implicat etiologic în BDA, după caz. Materiile fecale pot avea aspect hemoragic iar la examinarea macroscopică a p.p. putem observa prezenţa unor lambouri de mucoasă epitelială. Transportul se va realiza aşa cum am menţionat în capitolul nr. 28.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea preparatului nativ, între lamă şi lamelă; remarcăm prezenţa hematiilor şi leucocitelor PMN.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi capitolul nr. 28). În vederea izolării EHEC, pe lângă mediile menţionate în capitolul precedent se recomandă utilizarea mediului MacConkey cu D-sorbitol, deoarece spre deosebire de majoritatea tulpinilor de *E. coli* EHEC nu fermentează sorbitolul (sau îl fermentează tardiv). În acest sens, coloniile suspecte, repicate (fără a atinge mediul) în vederea identificării vor fi necolorate, cu dimensiuni de 1-3 mm, de regulă de tip S (coloniile sorbitol-pozitive vor avea o culoare roz).

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-negativi.
- Caractere de cultură:
  - Produc colonii de tip S cu caracterele menţionate mai sus.
- Caractere biochimice şi de mobilitate (pentru EHEC se vor examina la nivelul centrului de referinţă, necesitând măsuri suplimentare de siguranţă):
  - Fermentează glucoza (cu producere de gaz), sunt lactozo-pozitivi, nu fermentează (sau fermentează tardiv) sorbitolul, nu produc H_2S
  - Pot produce indol, sunt uree-pozitivi, mobili (dar există şi tulpini imobile) etc.
  - Se pot folosi mediile multi-test convenţionale (TSI, MIU/MILF) sau galeriile multi-test API 10 S, API 20 E, API Rapid 20 E sau alte variante
- Alte teste ce pot fi studiate în scopul identificării germenilor:
  - Testarea caracterelor antigenice: Ag somatice pot fi identificate prin reacţii de aglutinare sau latex aglutinare (se pot utiliza şi seruri monovalente anti O157 şi respectiv anti H7); toxinele pot fi identificate prin tehnici de tip ELISA, latex aglutinare, latex aglutinare pasivă inversată (VET-RPLA), sau prin seroneutralizarea efectului citotoxic pe celule Vero
  - Testarea caracterelor de patogenitate: EHEC produce enterocolită hemoragică letală la purcel; se poate studia efectul citopatic pe celule Vero
  - Teste de biologie moleculară (PCR, detectarea genelor de patogenitate pornind de la p.p. sau de la coloniile izolate pe MacConkey cu D-sorbitol).

5. Antibiograma este recomandată de regulă numai pentru supravegherea apariţiei fenomenului de rezistenţă la antibiotice şi chimioterapice; se realizează prin metode difuzimetrice.

UROCULTURA

Tractul urinar este în mod normal necontaminat, în schimb uretra distală poate prezenta o floră microbiană foarte variată, fiind **contaminată** cu microorganisme provenind din zona genitală sau de la nivelul colonului. Dintre aceste microorganisme putem izola de la nivelul uretrei distale stafilococi coagulazo-negativi, *E. coli, Klebsiella spp., Proteus spp.*, bacili difteromorfi, enterococi, streptococi, neisserii saprofite, *Mycoplasma spp., Ureplasma spp.* sau *Fusobacterium spp.* La acelaşi nivel ar putea fi identificate şi tulpini de *Candida spp., Clostridium spp.*, diferiţi coci gram pozitivi sau gram negativi anaerobi, lactobabili, mycobacterii netuberculoase, stafilococi aurii etc. Colonizarea microbiană a uretrei distale explică motivul pentru care în marea majoritate a cazurilor vom realiza **urocultura cantitativă.**

Cu toate că indiferent de grija cu care vom recolta p.p. (urina) acesta va fi contaminat, prin aprecierea cantitativă a numărului de unităţi formatoare de colonii în urina proaspăt recoltată, „din mijlocul jetului", putem să precizăm dacă pacientul are sau nu infecţie urinară. Mai multe studii au arătat că atunci când se demonstrează prezenţa a 10^5 bacterii/ml, aceasta indică o infecţie a tractului urinar (ITU) în aproximativ 80% dintre cazuri în timp ce o valoare de 10^4 bacterii/ml indică ITU în mai puţin de 30% dintre cazuri.

Datorită acestor rezultate, în practica medicală se consideră că ne aflăm în situaţia unei ITU atunci când numărul de bacterii/ml urină este $\geq 10^5$/ml.

Cu toate acestea, dorim să subliniem că interpretarea rezultatului nu trebuie realizată mecanic şi decizia finală în ceea ce priveşte identificarea bacteriei, efectuarea testării sensibilităţii la antibiotice şi respectiv redactarea buletinului de analiză ar trebui să fie luată având în vedere aspectul macroscopic al urinii (ex. purulent), rezultatul examenului microscopic al sedimentului urinar (ex. prezenţa de PMN), numărul de unităţi formatoare de colonii/ml urină şi elemente clinice (ex. disurie, micţiuni mai frecvente, febră), cu alte cuvinte colaborarea între clinică şi laborator este esenţială. Spre exemplu, în cazul unor elemente sugestive, chiar dacă numărul de bacterii este de 10^4/ml, putem lua decizia să repetăm urocultura, iar izolarea aceleiaşi bacterii poate indica prezenţa ITU. Pe de altă parte, izolarea a peste 10^4 unităţi formatoare/ml în cazul stafilococilor sau levurilor este luată în considerare, iar prezenţa în urină a *Listeria monocytogenes* la femeile însărcinate sau prezenţa în urină a *Salmonella typhi* sunt semnificative indiferent de numărul UFC/ml.

Pentru a sublinia încă o dată importanţa etapei de recoltare şi transport a urinei amintim faptul că urina reprezintă un foarte bun mediu de cultură pentru majoritatea bacteriilor care pot contamina p.p., iar o probă de urină care are iniţial (în momentul recoltării) 10^3 bacterii/ml, după 2 ore la temperatura camerei va conţine 10^5 bacterii/ml.

Clasificarea ITU se poate face după mai multe criterii. ITU joase includ cistita dar după unii autori şi uretrita, prostatita şi epididimita. ITU înalte includ pielonefrita acută, necroza papilară (complicaţie a pielonefritei acute sau care poate apărea în absenţa infecţiei), abcesul renal sau pielonefrita cronică (după unii autori). Invazia tractului urinar poate avea loc pe cale ascendentă, limfatică sau hematogenă.

Există o serie de factori care favorizează apariţia ITU, dintre care amintim: obstrucţiile care duc la stază urinară (adenom sau carcinom de prostată, tumori de vecinătate, stricturi

uretrale sau ale colului vezical, compresiune uretrală în timpul sarcinii, corpi străini, calculi urinari, cateterizare urinară etc), refluxul vezico-ureteral, alţi factori funcţionali.

Microorganismele mai frecvent implicate în producerea unei infecţii a tractului urinar sunt în ordine descrescătoare *E. coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Citrobacter freundii, Citrobacter diversus, Enterococcus faecalis,* stafilococii coagulază-negativi. Adenovirusurile pot determina cistite hemoragice la copii. Mai rar, în ordine descrescătoare etiologia ITU poate fi reprezentată de *Staphylococcus aureus, Acinetobacter calcoaceticus,* streptococi β-hemolitici din grupele A, B, C sau G, *Morganella morgani, Providencia rettgeri, P. stuartii, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Candida albicans, Salmonella spp., Corynebacterium urealyticum.* Cu privire la *E. coli,* cel mai frecvent microorganism implicat în ITU, există anumite grupuri uropatogene, spre ex. O1, O2, O7 etc. În mod cert, există diferenţe în ceea ce priveşte etiologia ITU pe grupe de vârstă, în funcţie de sex sau la pacienţii spitalizaţi în comparaţie cu pacienţii pentru care se solicită urocultura în ambulatoriu.

Recoltarea şi transportul produsului patologic

În ITU se pot recolta urină, sânge (ex. în pielonefrita acută) sau chiar şi LCR. În continuare vom discuta despre recoltarea şi transportul urinei.

În afară de recomandările generale menţionate anterior, trebuie să subliniem unele aspecte particulare

- În cazul în care nu se poate recolta prima urină de dimineaţă, trebuie aşteptat pentru recoltare 3-4 ore după micţiune
- Recoltarea se realizează după spălarea cu apă şi săpun a organelor genitale şi a perineului; există recomandări specifice pentru sexul feminin şi masculin şi respectiv pentru copilul mic
- Este preferabil ca recoltarea să aibă loc într-un spaţiu corespunzător în apropiere de laborator, iar personalul medical trebuie să explice şi eventual să asiste recoltarea
- Este contraindicată recoltarea urinei la domiciliu (pot exista erori de recoltare iar prelungirea timpului de transport va conduce la multiplicarea bacteriilor, aşa cum am menţionat mai sus); după recoltare, în cazul în care urina nu este prelucrată imediat (sau în cel mult 30 de minute după recoltare), p.p. trebuie menţinut la temperatura frigiderului iar transportul trebuie realizat la +4°C
- De regulă se recoltează urina „din mijlocul jetului"; după spălarea organelor genitale şi a perineului, prin micţiune se elimină circa 100 ml urină (îndepărtând astfel o parte a germenilor de la nivelul uretrei distale) şi abia apoi se recoltează 20-50 ml (preferabil 50 ml) urină în recipientul steril, după care micţiunea continuă
- Există şi alte tehnici de recoltare, neinvazive sau invazive (puncţie şi aspiraţie suprapubiană, cateterizare uretrală, cu riscurile respective).

Examinarea macroscopică şi microscopică a urinei

Realizăm iniţial examenul macroscopic; p.p. poate fi tulbure, opalescent, poate prezenta un anumit miros etc. În vederea examenului microscopic al urinei omogenizăm urina prin „răs-

turnare", de 2-3 ori. Punem o picătură de urină pe lamă, acoperim cu o lamelă şi examinăm cu microscopul cu imersie (sau microscopul cu contrast de fază). În cazul în care identificăm prezenţa a cel puţin unei bacterii pe fiecare câmp, în fiecare dintre 5 câmpuri succesive, putem cu o bună aproximaţie să considerăm că avem o bacteriurie de 10^5 bacterii/ml. Alternativ se poate utiliza preparatul colorat Gram. Este necesar să apreciem concomitent şi prezenţa piuriei (peste 10 leucocite/mm^3 de urină). Au fost imaginate o serie de alte teste pentru aprecierea piuriei şi bacteriuriei, spre exemplu testul Griess (detectarea nitriţilor în urină), detectarea esterazei leucocitare, teste bioluminiscente etc. Piuria şi bacteriuria trebuie interpretate în contextul clinic.

Examenul sedimentului urinar permite vizualizarea de celule epiteliale (malpighiene, vezicale, uretrale etc), celule sanguine (leucocite, hematii), cilindrii urinari (hialini, leucocitari, eritrocitari, epiteliali, granulari etc), cristale urinare, levuri (eventual înmugurite, cu blastoconidii), *Trichomonas vaginalis* etc; examenul sedimentului urinar este foarte util şi trebuie realizat de fiecare dată.

Cultivarea urinei

În mod obişnuit, pentru cultivare putem utiliza 3-4 medii diferite. Din motive de economie am putea însămânţa o jumătate de placă cu mediu MacConkey (fără cristal violet), o jumătate de placă cu geloză-sânge şi câte un sector de placă cu mediu agar telurit şi respectiv agar cu eozină şi albastru de metilen (EMB) în cazul în care examenul microscopic al urinei este pozitiv. Dacă examenul microscopic este negativ, însămânţăm doar o jumătate de placă Petri cu mediu MacConkey.

O variantă de însămânţare pentru mediile MacConkey şi geloză-sânge este utilizarea unei anse calibrate de 1 µl cu ajutorul căreia prelevăm urină prin atingerea suprafeţei p.p. după omogenizare. Însămânţăm iniţial un striu pe centrul jumătăţii de placă după care întindem p.p. în striuri paralele, perpendiculare pe primul striu. În final fără sterilizăm ansa întindem p.p în striuri paralele în unghi de 45 faţă de striurile precedente. După o incubare de 18-24 ore la 35-37°C, înmulţind cu 1000 numărul de UFC dezvoltate, putem aprecia care este numărul de bacterii/ml de urină.

Frecvent este utilizată însămânţarea urinei după diluare (ex. 1/100) cu ajutorul pipetei gradate. Însămânţăm de ex. pe o placă cu mediu MacConkey 0,1 ml de urină diluată 1/100, incubăm în condiţiile cunoscute şi după apariţia coloniilor calculăm numărul de bacterii/ml prin înmulţirea numărului de UFC × inversul diluţie × inversul volumului însămânţat.

Interpretarea rezultatelor uroculturii cantitative

- Izolarea unei bacterii cu o concentraţie de peste 10^5/ml de urină confirmă ITU la bărbat sau la femeie (cu simptome caracteristice); în cazul că pacienta este asimtomatică, certificarea ITU este dată de izolarea aceleaşi bacterii în a doua probă de urină
- Izolarea a două bacterii diferite, fiecare cu o concentraţie de peste 10^5/ml de urină, impune repetarea recoltării şi însămânţării; în cazul în care rezultatul este similar şi pentru a doua probă de urină este posibilă ITU mixtă (în caz contrar este o foarte probabilă contaminare)

- Izolarea a trei bacterii diferite, chiar şi în cazul în care concentraţiile pentru fiecare în parte depăşesc 10^5/ml de urină, impune repetarea analizei; extrem de probabil este vorba de o contaminare sau de un p.p. recoltat cu mai mult timp în urmă şi menţinut la temperatura camerei şi nu la frigider
- Izolarea unei bacterii cu o concentraţie de 10^4/ml de urină conduce la recomandarea repetării analizei (există şi unele excepţii, în care rezultatul este considerat pozitiv, spre ex. pentru levuri în concentraţie de peste 10^4/ml de urină, stafilococii coagulazo-negativi în concentraţie de peste 5×10^4/ml de urină etc)
- Lipsa multiplicării bacteriene sau dezvoltarea de UFC în concentraţie de 10^3/ml de urină reprezintă o urocultură negativă
- Dorim să subliniem din nou că rezultatul microbiologic trebuie să fie analizat în contextul clinic şi corelat cu rezultatul microscopiei iar în cazul anumitor bacterii (ex. *Salmonella typhi)* rezultatul este pozitiv indiferent de concentraţia UFC/ml de urină.

În cazul unei uroculturi pozitive, bacteria izolată se identifică (pe baza caracterelor morfotinctoriale, de cultură, biochimice, alte caractere) şi se testează sensibilitatea la antibiotice şi chimioterapice, de regulă prin metoda difuzimetrică (vezi capitolul 14).

Există o serie de încercări pentru optimizarea diagnosticului ITU, inclusiv abordarea unor tehnici miniaturizate. Dintre acestea vom aminti metoda imaginată în Institutul de boli infecţioase „Matei Balş" (prof. Florin Căruntu), metoda **„Uriline"** etc. Spre exemplu ultima dintre metode utilizează o lamă de plastic acoperită pe ambele părţi cu mediu de cultură, protejată într-un tub de plastic.

Principiu

Mediul CLED de pe prima parte a lamei (Cysteine - Lactose - Electrolyte Deficient agar) are culoare verde şi permite numărarea coloniilor bacteriene (indirect a numărului de UFC/ml urină) şi identificarea prezumtivă. Concentraţia scăzută de electroliţi inhibă invazia *Proteus spp.* Mediul MacConkey fără cristal violet de pe a doua parte a lamei are culoare roz; inhibă majoritatea bacteriilor gram pozitive.

Tehnica de lucru

Deşurubăm capacul şi extragem lama fără să atingem suprafaţa agarului. Imersăm lama în proba de urină recoltată (dacă urina nu este suficientă cantitativ, repartizăm p.p. pe cele 2 părţi ale lamei cu ajutorul unei pipete Pasteur). Îndepărtăm excesul de urină pe o hârtie de filtru curată şi punem la loc în dispozitiv lama însămânţată. Incubăm în poziţie dreaptă, timp de 18-24 ore la 35-37°C. A doua zi citim rezultatele, comparând numărul de colonii apărute pe mediul CLED cu modelul producătorului.

Interpretare

În cazul în care numărul de UFC/ml este mai mare de 10^5 realizăm teste suplimentare pentru identificare şi respectiv antibiograma. Alte elemente privind interpretarea au fost prezentate anterior.

Control de calitate

- Pregătim o suspensie bacteriană în soluţie salină fiziologică sterilă cu 10^5-10^6 bacterii pe ml din fiecare dintre tulpinile de referinţă

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Proteus mirabilis* ATCC 12453

- Inoculăm suspensiile astfel pregătite pe suprafaţa mediilor de cultură Uriline, iar după 18-24 ore incubare citim şi interpretăm rezultatele
- *Staphylococcus aureus:* apar colonii doar pe mediul CLED. Fermentarea lactozei este indicată de prezenţa culorii galbene în jurul coloniilor dezvoltate.
- *Escherichia coli:* apar colonii galbene pe CLED şi colonii roz pe MacConkey.
- *Proteus mirabilis:* apar colonii translucide iar culoarea CLED este albastră; pe Mac Conkey apar colonii incolore.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

30. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *SHIGELLA*

Genul *Shigella* ar trebui să facă parte conform studiilor de biologie moleculară dintr-un gen care include şi *Escherichia spp.*, genul *Escherichia-Shigella.* Actualmente este acceptată tratarea separată a celor două genuri înrudite. Pe baza structurii antigenice au fost diferenţiate patru subgrupe (A-D) respectiv *Shigella dysenteriae* (13 serotipuri), *S. flexneri* (6 serotipuri care se pot subdiviza în sub-serotipuri), *S. boydii* (18 serotipuri) şi *S. sonnei* (1 serotip cu 2 faze sau variante, respectiv R şi S).

Genul *Shigella* include bacili gram negativi, imobili, cu dimensiuni de 0,5-0,8μm/2-3 μm, nesporulaţi, necapsulaţi, aerobi facultativ anaerobi, glucozo pozitivi fără producere de gaz oxidazo negativi, lactozo negativi. Subgrupele se pot diferenţia de ex. pe baza fermentării manitei (subgrupul A este manito negativ). Cresc pe medii simple şi produc colonii de tip S în 24 de ore.

Microorganismele din genul *Shigella* sunt patogene prin multiplicare şi invazivitate. În cazul serotipului 1 din subgrupul A *(Sh. shiga)* este implicată şi toxigeneza. Exotoxina shiga afectează atât intestinul cât şi sistemul nervos central (putând conduce la apariţia unor fenomene de meningism sau chiar pierderea stării de conştienţă, până la comă). Faţă de animalele de experienţă are efect letal.

Infecţiile cu *Shigella spp.* sunt de regulă limitate la nivelul tractului intestinal. Dizenteria poate apărea după ingestia a numai 10-100 de bacterii, care se localizează, se multiplică şi invadează epiteliul intestinal (pot apărea abcese la nivelul peretelui intestinului gros, la nivelul ileonului terminal, abcese care evoluează spre ulceraţie, necroză, hemoragie). După o perioadă de incubaţie de circa 2-5 zile, în cazul unei dizenterii tipice apar brusc febră, diaree apoasă, dureri abdominale intense. Ulterior se elimină scaune foarte numeroase (20-40/zi), nefecaloide, cu mucus, puroi şi sânge, însoţite de colici intestinale şi tenesme rectale. Starea generală se înrăutăţeşte (mai grav în cazul unei infecţii produse de *Sh. shiga).* În lipsa tratamentului corespunzător (în special în lipsa reechilibrării hidro-electrolitice) evoluţia poate fi fatală. În afară de dizenterie, *Shigella spp.* poate produce şi toxiinfecţii alimentare de tip infecţios.

Diagnosticul de laborator microbiologic este bacteriologic (direct) şi trebuie făcut de urgenţă datorită implicaţiilor posibile ale unei dizenterii.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii şi înainte de iniţierea antibioterapiei. Produsul patologic este reprezentat de **materii fecale,** dar s-ar putea recolta şi lichid de vărsătură. La începutul bolii este mai uşor să izolăm bacteria patogenă, deoarece iniţial se elimină circa 10^3-10^9 bacterii/gram de materii fecale. Din punct de vedere **macroscopic** materiile fecale pot fi în cantitate mică, conţinând mucus, puroi şi sânge (uneori sângele nu este vizibil macroscopic). Recomandăm recoltarea şi cul-

tivarea în special a fragmentelor care conţin mucus, puroi şi sânge. Transportul trebuie să fie realizat rapid, dar este preferabilă însămânţarea la patul bolnavului. Dacă această recomandare nu poate fi urmată, recomandăm folosirea unui mediu de transport, mediul bacteriostatic Cary-Blair. O altă variantă de recoltare posibilă (de ex. în cazuri atipice sau pentru controlul stării de „purtător") este reprezentată de utilizarea sondei Nelaton introdusă în colonul sigmoid (10-12 cm la copil sau 15-20 cm la adult) aspirând p.p. cu ajutorul unei seringi. Materiile fecale se vor suspensiona în soluţie cloruro-sodică sau în mediul Cary-Blair. Există şi posibilitatea de a recolta p.p. prin rectosigmoidoscopie.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea unui preparat proaspăt între lamă şi lamelă (nu efectuăm frotiuri din acest tip de produsul patologic, în cazul în care suspectăm o infecţie cu *Shigella spp.).* Preparatul se examinează la microscopul optic cu obiectivul 40×. Evidenţierea a numeroase PMN vine în sprijinul stabilirii mecanismului bolii diareice, iar un procent de peste 75% PMN însoţit de prezenţa hematiilor este sugestiv pentru dizenteria bacteriană. Anumiţi autori recomandă utilizarea imunofluorescenţei directe; examenul este costisitor în special datorită existenţei numeroaselor serotipuri.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Se vor utiliza mediile de cultură recomandate, prezentate în capitolul 28. *Shigella* se dezvoltă pe mediile slab şi moderat selective şi nu se multiplică pe mediile înalt selective. În cazul apariţiei unor colonii lactozo negative, repicăm 3-5 colonii izolate pe mediile multitest (TSI, MIU MILF) sau procedăm conform protocolului de lucru pentru galeriile tip API.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-negativi cu cu dimensiuni de 0,5-0,8 μm/ 2-3 μm;
- Caractere de cultură:
  - produc colonii de tip S, lactozo negative, semitransparente, cu diametrul de 1-2 mm pe MacConkey sau ADCL (S. sonnei poate produce colonii care devin roz deoarece poate fermenta tardiv, lactoza) şi roşii pe XLD
- Caractere biochimice şi de mobilitate:
  - se pot investiga analizând rezultatele obţinute pe mediile multitest sau pe galeriile API; caracterele biochimice sunt utile şi în diferenţierea subgrupelor genului
  - microorganismele din genul *Shigella* sunt glucozo pozitive, fără producere de gaz, lactozo negative, nu produc H_2S, imobile, uree negative, indol negative
  - pot fi necesare teste biochimice suplimentare
- Caractere antigenice:
  - se utilizează seruri imune polivalente pentru subgrup sau seruri imune specifice de tip, prin reacţii de aglutinare pe lamă, conform unor scheme stabilite
  - în cazul în care o tulpină izolată are un comportament biochimic sugestiv dar reacţia de aglutinare este negativă, trebuie să realizăm o suspensie (destul de densă)

din respectiva tulpină, pe care o menţinem timp de 30-60 minute la o temperatură de 100°C şi ulterior repetăm reacţia de aglutinare

- Testarea sensibilităţii la bacteriofagi (lizotipia) se poate utiliza în studii epidemiologice sau în scop de cercetare, fiind rezervată laboratoarelor de referinţă; schemele de lizotipie au fost utilizate în special pentru *S. flexneri* 2a şi *S. sonnei*
- Alte caractere/teste utilizate în identificare la nivelul centrelor de referinţă:
  - teste biochimice suplimentare (biotipie)
  - bacteriocinotipie (ex. pentru *S. sonnei)*
  - rezistotipie (tipare prin patern-ul rezistenţei la antibiotice), utilă în scop epidemiologic
  - testul Sereny (producerea cheratoconjunctivitei la cobai); repicăm colonia suspectă pe geloză înclinată iar după 8 ore, introducem o ansă de cultură sub pleoapa unui cobai; după 12-24 ore în cazul unei reacţii pozitive apare congestie conjunctivală, secreţie purulentă şi opacifiere a corneei cu accentuarea acestor fenomene şi evoluţie spre cheratoconjunctivită (testul poate fi pozitiv şi în cazul unor tulpini de *Escherichia coli)*
  - tehnici ale biologiei moleculare (stabilirea profilului plasmidic, ribotipia, sondele ADN etc).

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice) se realizează prin metoda difuzimetrică standardizată, în special în scopul supravegherii apariţiei unor tulpini rezistente la medicamentele antimicrobiene dar şi pentru stabilirea tratamentului antimicrobian corespunzător.

BCU IASI CENTRAL LIBRARY

31. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *SALMONELLA*

Există mai multe clasificări pentru microorganismele care aparţin genului *Salmonella.* Una dintre clasificările acceptate (Ewing) grupează genul în 3 specii şi anume *S. typhi* (patogenă doar pentru om), *S. cholerae suis* (patogenă la porc, ocazional şi la om) şi *S. enterica* (produce boli diareice la om şi la animal, cu aproximativ 2000 de serotipuri). Este încă bine cunoscută schema de identificare serologică (Kaufmann-White) care subîmparte genul *Salmonella* în grupe care includ foarte multe „specii", spre ex. grupul A *(S. paratyphi A),* grupul B *(S. paratyphi B, S. typhimurium),* grupul C *(S. paratyphi C),* grupul D *(S. typhi, S. enteritidis)* etc.

Genul *Salmonella* include bacili gram negativi, cu dimensiuni de 2-4 μm/0,4-0,6 μm, mobili cu cili peritrichi (cu excepţia *S. galinarum pullorum),* necapsulaţi, nesporulaţi, glucozo-fermentativi (cu producere de gaz cu excepţia *S. typhi),* nu fermentează lactoza, produc H_2S (există şi excepţii) şi utilizează citratul ca unică sursă de carbon.

Infecţiile produse de microorganismele care aparţin genului *Salmonella* se pot împărţi în salmoneloze minore (enterocolite, toxiinfecţii alimentare) şi salmoneloze majore (febră tifoidă, febre enterale).

Enterocolita (gastroenterita, toxiinfecţia alimentară de tip infecţios) apare după ingestia a 10^5-10^8 salmonele. Febra tifoidă (febra enterală) poate apărea după ingerarea a circa 10^3 salmonele. Febra tifoidă este o boală gravă care în lipsa tratamentului poate conduce la deces. *S. typhi* trece prin şi printre celulele epiteliale de la nivelul ansei ileocecale, se multiplică activ în submucoasă şi este fagocitată de macrofage unde supravieţuieşte şi continuă să se multiplice. Microorganismele trec apoi în ganglionii mezenterici, în canalul toracic şi conduc la apariţia unei prime bacteriemii urmată de invadarea altor organe şi formaţiuni limfatice. Multiplicarea importantă, în special la nivelul organelor cu sistem reticulo-endotelial bine reprezentat (ficat, splină), este urmată de o a doua bacteriemie masivă şi de eliminarea prin bilă şi/sau urină. La sfârşitul primei săptămâni de boală, *S. typhi* se elimină din foliculii intestinali şi prin bilă în materiile fecale, excreţia prelungindu-se mult timp în convalescenţă. Pot apărea angiocolită, colecistită; bolnavul poate deveni purtător (ex. la nivelul veziculei biliare) după vindecare.

În cazul afecţiunilor strict digestive, diagnosticul de laborator microbiologic este bacteriologic, direct. În cazul afecţiunilor sistemice, diagnosticul poate fi bacteriologic şi/sau serologic.

Diagnosticul de laborator microbiologic în infecţiile cu localizare digestivă

Diagnosticul bacteriologic (direct) cuprinde etapele cunoscute.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute. Produsul patologic este reprezentat de obicei de **materiile fecale** dar am

putea recolta şi lichid de vărsătură, un anumit aliment incriminat etc. Materiile fecale se examinează macroscopic şi se trimit către laborator aşa cum am menţionat în capitolul 28.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea preparatului nativ, între lamă şi lamelă; putem remarca prezenţa granulocitelor mononucleare.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care urmează a fi identificată (vezi capitolele 9-10 şi 28). Pentru izolarea şi identificarea agentului patogen p.p. este însămânţat pe un mediu lichid de îmbogăţire (bulion selenit) şi pe două medii gelozate selectivo-diferenţiale (MacConkey şi ADCL/XLD). După o incubare de 18-24 ore la 35-37°C, pe mediile solide pot apărea colonii bacteriene suspecte (lactozo-negative) din care obţinem cultura pură în scopul identificării şi stabilirii sensibilităţii la antibiotice. Pentru a creşte şansa depistării agentului cauzal, cultura de 18-24 ore în bulion selenit va fi trecută pe mediile solide (pe MacConkey şi ADCL/XLD).

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic izolat în cultură pură se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-negativi.
- Caractere de cultură:
  - Produc colonii de tip S, lactozo-negative, cu diametrul de 1-3 mm (necolorate şi semitransparente pe MacConkey; necolorate dar cu centrul negru pe ADCL; roşii, semitransparente, cu centrul negru pe XLD). În cazul în care a fost folosit şi mediul Wilson Blair (foarte selectiv, care nu include lactoză) coloniile sunt negre, cu margini neregulate şi halou metalic.
- Caractere biochimice şi de mobilitate:
  - Fermentează glucoza (cu producere de gaz), sunt lactozo-negativi, produc H_2S, (exisă şi excepţii) şi utilizează citratul ca unică sursă de carbon.
  - Nu produc indol, sunt urează-pozitivi, mobili, produc lizindecarboxilază şi ornitindecarboxilază etc.
  - Pentru punerea în evidenţă a caracterelor biochimice se pot folosi mediile multitest convenţionale (TSI, MIU, MILF) sau galeriile multi-test (API 10 S, API 20 E, API Rapid 20 E sau alte variante).
- Caractere antigenice:
  - se utilizează seruri imune specifice, în scheme care folosesc iniţial Ac anti-O şi ulterior, în funcţie de rezultatul obţinut, Ac anti-H, prin reacţii de aglutinare pe lamă conform schemei Kauffmann-White (există tabele şi scheme care trebuie respectate);
  - în cazul în care o tulpină izolată are un comportament biochimic sugestiv dar reacţia de aglutinare este negativă, trebuie să realizăm o suspensie (destul de densă) din respectiva tulpină, pe care o menţinem timp de 30-60 minute la o temperatură de 100°C şi ulterior repetăm reacţia de aglutinare.
- Alte teste ce pot fi realizate în scopul identificării germenilor, de regulă la nivelul centrului de referinţă:

- scheme suplimentare pentru testarea caracterelor antigenice (serotipie)
- teste suplimentare biochimice (biotipie)
- teste privind sensibilitatea la bacteriofagi specifici (lizotipie)
- teste de biologie moleculară (determinarea profilului plasmidic, ribotipia, studiul unor secvenţe specifice la nivel cromozomial etc).

5. Antibiograma este recomandată de regulă numai în cazul pacienţilor cu vârste extreme sau pentru supravegherea apariţiei fenomenului de rezistenţă la antibiotice şi chimioterapice; se realizează prin metode difuzimetrice.

Diagnosticul de laborator microbiologic în febrele enterale este bacteriologic şi/sau serologic.

Diagnosticul **definitiv** (cert) este reprezentat de **izolarea şi identificarea** *S. typhi* în p.p.

Diagnosticul bacteriologic, direct respectă etapele cunoscute ale acestui tip de diagnostic, cu anumite particularităţi. Multe din aspecte au fost prezentate anterior.

Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii şi înainte de iniţierea antibioterapiei. Produsul patologic este reprezentat în prima săptămână de **sânge**, ulterior putem recolta materii fecale, urină, lichid biliar, măduvă hematogenă etc. Hemocultura va fi discutată în cele ce urmează. În cazul în care p.p. este reprezentat de **materii fecale**, respectăm ceea ce am prezentat mai sus, cu o serie de sublinieri:

- Sunt în studiu metode de identificare a prezenţei *S. typhi*, direct în p.p. (ex. materii fecale) prin latexaglutinare şi PCR

- Coloniile de *S. typhi* pot să nu prezinte centrul de culoare neagră pe ADCL sau XLD.

- *S. typhi* în general nu produce gaz din glucoză, iar H_2S poate fi produs în cantităţi mici şi tardiv; nu foloseşte citratul ca unică sursă de carbon şi este ornitindecarboxilază negativă.

- Pentru identificarea Ag O poate fi necesară o inactivare prealabilă (termică, folosind o substanţă acidă sau acetonă). Pentru identificarea Ag H poate fi necesară inactivarea cu formaldehidă. Prezenţa Ag Vi poate crea probleme în ceea ce priveşte identificarea Ag O.

- Deşi lizotipia este o metodă laborioasă, de multe ori se dovedeşte superioară din punctul de vedere al rezultatelor obţinute în comparaţie inclusiv cu metode ale biologiei moleculare.

- Testarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice este recomandată pentru fiecare tulpină de *S. typhi* izolată.

Diagnosticul serologic

Unii autori consideră că nici unul dintre testele utilizabile în diagnosticul serologic nu este suficient de specific, sensibil şi rapid. Diagnosticul serologic se realizează respectând principiile generale ale acestui tip de diagnostic. Reacţia **Widal** a fost imaginată în finalul secolului al IX-lea şi standardizată la mijlocul secolului XX. Serodiagnosticul Widal, folosind culturi vii de *S. typhi* nu se mai practică astăzi. Cea mai cunoscută metodă utilizabilă actual este **analiza serică cantitativă**, realizată tot prin tehnica aglutinării în tuburi. Utilizăm serii separate de tuburi, câte o serie pentru fiecare **Ag cunoscut** folosit, serul de cercetat fiind diluat corespunzător protocolului de lucru. Atunci când presupunem o febră

tifoidă sau paratifoidă utilizăm spre ex. 6 serii de tuburi, cu Ag cunoscute şi inactivate, pentru a evidenţia Ac anti-O (TO – *S. typhi*, AO – *S. paratyphi* A, BO – *S. paratyphi B*), şi anti-H (d – *S. typhi*, a – *S. paratyphi* A, b – *S. paratyphi B*). După realizarea diluţiilor, incubăm tuburile pentru Ac anti-O timp de 18-20 ore la 52°C urmat de 10 minute la temperatura camerei, iar tuburile pentru Ac anti-H timp de 2 ore la 52°C urmat de 10 minute la temperatura camerei şi citim reacţia. Un titru de 1/250 în cazul Ac anti-O şi respectiv 1/2500 în cazul Ac anti-H ar putea fi sugestiv. Creşterea de 4 ori a titrului la 2 determinări succesive (interval de 7-10 zile) poate confirma diagnosticul. La persoanele vaccinate recent diagnosticul serologic nu poate fi utilizat (rezultatele nu sunt interpretabile) şi este strict necesară izolarea în culturi a *S. typhi*.

Atât în cazul bolnavilor, dar mai ales în cazul convalescenţilor şi purtătorilor a fost recomandată reacţia de aglutinare în tuburi pentru identificarea prezenţei şi titrului Ac anti-Vi. Se consideră că un titru ≥ 1/40 poate fi considerat sugestiv.

HEMOCULTURA

Arborele circulator este în mod normal steril.

Bacteriemia/fungemia reprezintă prezenţa **tranzitorie** şi de regulă **intermitentă** a bacteriilor/fungilor în torentul circulator. O bacteriemie/fungemie se poate însoţi de creşterea temperaturii şi/sau frison precum şi de alte semne sau simptome. Dintre situaţiile care pot conduce la apariţia unei bacteriemii putem aminti: o extracţie dentară, periajul mai energic al dinţilor folosind o periuţă neadecvată (prea dură) precum şi multe acte medicale sau medico-chirurgicale invazive realizate la diferite niveluri anatomice (cateterisme etc).

Bacteriemia/fungemia **însoţesc infecţiile generalizate** cu bacterii/fungi. Există o mare varietate de microorganisme capabile să producă infecţii generalizate (bacterii aerobe şi anaerobe, fungi, virusuri, paraziţi). Trebuie însă menţionat că, destul de frecvent, o hemocultură pozitivă nu indică de fapt agentul etiologic al infecţiei ci o contaminare survenită pe parcursul diagnosticului microbiologic. Dintre agenţii contaminanţi întâlniţi mai frecvent putem aminti: *Staphylococcus epidermidis, S. hominis, Micrococcus luteus, Corynebacterium spp., Brevibacterium epidermidis, Propionebacterium acnes, Acinetobacter calcoaceticus*, streptococii non-hemolitici etc. Este importantă utilizarea noţiunilor de **microbiologie clinică** care trebuie foarte bine cunoscute de către medicul microbiolog în colaborare cu restul membrilor echipei complexe, pentru stabilirea în mod corespunzător a etiologiei infecţioase şi atitudinii de urmat.

Având în vedere cele menţionate mai sus, dorim să subliniem şi alte două dintre aspectele importante de care trebuie să se ţină seama în realizarea unei hemoculturi:

- **momentul** recoltării sângelui
- **volumul** de sânge recoltat.

Cu privire la primul aspect este de reţinut că întotdeauna se recomandă recoltarea a minim 2 probe de sânge, însă cel mai frecvent sunt recoltate 3 probe de sânge, în momente diferite, pe parcursul a 24 de ore. În anumite cazuri (de ex. în endocardita bacteriană subacută), bacteriemia fiind continuă, sunt suficiente 2 hemoculturi/24 ore. Pe de altă parte, în cazul în care presupunem că agentul etiologic poate face parte din flora normală vom recolta

minim 3 probe pentru hemocultură. În cele ce urmează o să listăm câteva din exemplele posibile, în ceea ce privește momentul recoltării sângelui și numărul de hemoculturi recomandate:

- endocardită acută – recoltăm 3 hemoculturi din 3 sedii diferite, pe parcursul a 1-2 ore;
- endocardită subacută – recoltăm minim 2 hemoculturi din 2 sedii diferite (vezi și mai sus) la un interval mai mare de 15 minute;
- sepsis – recoltăm 3 hemoculturi din sedii diferite, pe parcursul a 10 minute (ideal ar fi, pentru toate cazurile menționate, să recoltăm sângele cu circa 30 minute înainte de „vârful febril", acest moment ar coincide cu cea mai mare concentrație de microorganisme în torentul circulator, dar este dificil de precizat);
- febră de origine necunoscută – recoltăm 2-3 hemoculturi, din sedii diferite, la un interval de timp de 45-60 minute etc.

În ceea ce privește al doilea aspect, având în vedere faptul că de regulă în cursul bacteriemiilor/fungemiilor numărul de unități formatoare de colonii/ml de sânge este destul de redus, trebuie să recoltăm un volum de sânge adecvat (pentru fiecare hemocultură în parte). Astfel, vom recolta circa 20 ml de sânge în cazul adulților și 1-5 ml de sânge în cazul nounăscuților, sugarilor și copiilor mici (deoarece numărul de UFC/ml poate fi de circa 3 ori mai mare la aceste grupe de vârstă).

Atunci când este necesară realizarea unei hemoculturi (de fapt a unui „set" de hemoculturi) este necesar să ne gândim și la următoarele aspecte:

- cel mai adesea hemoculturile trebuie realizate „în urgență";
- sângele, fiind un produs biologic în mod normal steril, vom izola cel mai adesea un singur agent infecțios (dar există și posibilitatea unor asocieri);
- dintre agenții etiologici cu semnificație clinică izolați mai frecvent prin hemocultură, în ordine descrescândă a frecvenței putem aminti: *Staphylococcus aureus, diferite enterobacterii, Pseudomonas aeruginosa,* streptococi hemolitici (inclusiv pneumococul), enterococi, *Haemophilus influenzae* (tip b), *Neisseria meningitidis,* germeni anaerobi *(Bacteroides fragilis, Fusobacterium spp., Peptostreptococcus spp., Clostridium perfringens* etc), stafilococi coagulazo-negativi, *Listeria monocytogenes, Leptospira spp., Brucella spp., Candida spp., Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Aspergillus spp.* etc.;
- există anumite particularități în ceea ce privește etiologia infecțiilor generalizate în funcție de vârsta pacienților, poarta de intrare posibilă, focarul infecțios principal, starea din punctul de vedere al apărării (specifice și nespecifice) a gazdei respective etc.;
- în sânge există o serie de factori antimicrobieni a căror acțiune trebuie pe cât posibil diminuată (aceasta se realizează pe de o parte prin diluarea 1/10 a sângelui cultivat în raport cu volumul mediului de cultură dar există și o serie de substanțe chimice care pot fi utilizate în același scop, spre ex. polianetol sulfonatul de sodiu are atât efect anticoagulant cât și de neutralizare a unor factori antimicrobieni);
- mediile de cultură și condițiile de incubare trebuie ales în așa fel încât să permită dezvoltarea agenților etiologici probabili;

- asigurarea calităţii mediilor de cultură va include atât controlul sterilităţii fiecărui lot cât şi controlul eficienţei acestora (prin inocularea mediilor cu tulpini de referinţă, de colecţie).

Pentru recoltarea sângelui trebuie respectate condiţiile impuse recoltării oricărui tip de p.p. Subliniem însă importanţa respectării cu stricteţe a regulilor de **prelevare aseptică** şi respectiv a recoltării sângelui **înainte de administrarea** oricărui tratament antimicrobian. Oricât de urgent ar fi considerat că trebuie începută terapia se poate „temporiza" până se realizează recoltarea sângelui pentru hemocultură, ceea ce în astfel de situaţii ar necesita un interval de timp de numai 10-15 minute.

Utilizarea sistemelor cu vacuum este relativ recentă în ţara noastră; în SUA a fost utilizată încă înainte de 1974. Este recomandat ca recoltarea să fie urmată de însămânţarea direct pe mediul de cultură, „la patul bolnavului", spre exemplu într-un sistem închis de recoltarea şi însămânţare aşa cum a fost realizat de Prof. Dr. Matei Balş. Altfel spus, recoltarea ar trebui să fie urmată imediat de însămânţare, fără a mai exista o etapă de transport. Dacă această recomandare nu poate fi urmată am putea folosi un tub care conţine 1 ml dintr-o soluţie 0,25-0,50% de polianetol sulfonat de sodiu în care realizăm recoltarea sângelui şi pe care îl transmitem imediat către laborator pentru însămânţarea pe medii de cultură.

Mediile de cultură sunt medii lichide, îmbogăţite (ex. bulion infuzie de cord-creier pentru aerobi şi respectiv bulion Columbia cu cisteină pentru anaerobi) condiţionate în flacoane corespunzătoare cantităţii de sânge pe care trebuie să o recoltăm. Pentru bacteriile cu multiplicare lentă este recomandată utilizarea mediului bifazic (mediu solidificat în pantă, de ex. geloză-chocolat plus mediul lichid bulion tripticază din soia). În finalul prezentării vom discuta şi despre sistemele automate pentru hemocultură.

În cazul în care recoltarea a fost realizată simultan în două flacoane pentru hemocultură, unul va fi incubat în aerobioză iar celălalt în anaerobioză. Pentru unele microorganisme (ex. *Brucella spp.)* este necesară incubarea în atmosferă de 5-10% CO_2. Temperatura de incubare este cel mai frecvent 35-37°C.

Examinarea flacoanelor de hemocultură se realizează de 2 ori/zi în primele 3 zile, apoi zilnic pentru minim 7 zile (în anumite situaţii flacoanele pot fi incubate timp de mai multe săptămâni). Examinarea o facem macroscopic urmărind o serie de aspecte care ar putea să semnifice dezvoltarea microbiană (tulburarea mediului mai mult sau mai puţin uniformă, apariţia unei pelicule la suprafaţa mediului lichid, apariţia unui depozit pe stratul de hematii din zona declivă a flaconului, apariţia unor bule de gaz, apariţia unor colonii pe mediul solid în cazul în care am utilizat mediul bifazic etc). Din punct de vedere microscopic, manipulând aseptic flacoanele de hemocultură putem realiza frotiuri pe care le colorăm Gram.

În cazul apariţiei unor modificări precum cele descrise mai sus dar şi atunci când acestea nu apar („treceri oarbe") vom realiza subcultivări pe medii de cultură solide (de ex. geloză chocolat). Prin utilizarea mediului bifazic subcultivarea se realizează uşor şi fără riscul contaminării, prin simpla înclinarea a flaconului şi „scăldarea" pantei cu mediul de cultură solid).

După obţinerea culturii pure trecem la identificarea agentului etiologic şi stabilirea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice a acestuia. În vederea testării sensibilităţii la antibiotice putem utiliza ca inocul bulionul de hemocultură, dar rezultatele obţinute vor fi confirmate prin antibiograma difuzimetrică standardizată pornind de la coloniile izolate (cultura pură).

În momentul de faţă există numeroase **sisteme automate** utilizate pentru hemocultură (BacT/Alert, Isolator, BACTEC, Septi-Chek, Vital etc).

Spre exemplu, sistemul BacT/Alert reprezintă un instrument automat pentru detectarea multiplicării microbiene, capabil să incubeze, să agite şi să monitorizeze continuu (pe bază de reflectometrie) aerob şi anaerob prelevate de la pacienţi suspecţi de bacteriemie/fungemie.

Instrumentul prezintă:

- un modul de control care include un ecran ce permite operatorului să intervină (prin atingerea cu degetul) în alegerea opţiunilor de încărcare şi descărcare a flacoanelor introduse,
- un modul de incubare ce poate prelucra 120 până la 240 flacoane însămânţate,
- posibilitatea realizării automate a controlului de calitate al „celulelor" în care sunt introduse flacoanele (nefiind necesară intervenţia operatorului).

Intervalul optim de funcţionare al instrumentului este situat între +5° şi 45°C. Flacoanele introduse în instrument sunt recunoscute de acesta cu ajutorul unui cititor de cod de bare (codul se află pe partea laterală a flaconului). Flacoanele şi instrumentul sunt produse în conformitate cu standardele internaţionale de calitate în vigoare (ISO 9001, FDA şi Quality System Regulations). Flacoanele de cultură conţin mediu de cultură lichid (bulion), care permit multiplicarea majorităţii speciilor bacteriene precum şi a fungilor. Fiecare flacon conţine un senzor LES (senzor emulsie lichidă), ce detectează producerea de CO_2, ca indicator al multiplicării microbiene.

Există mai multe tipuri de flacoane, pentru incubare în aerobioză, anaerobioză, pentru adulţi sau copii, pentru pacienţi la care nu s-au administrat medicamente antimicrobiene anterior recoltării (varianta strict recomandată) sau chiar şi pentru pacienţi aflaţi sub tratament antibiotic.

Citirea se efectuează automat la fiecare 10 minute, rezultând o medie de 144 citiri/zi, prin reflectometrie cu afişaj pe monitor, semnal luminos sau sonor. În cazul unui rezultat pozitiv, flaconul respectiv este analizat prin metode ale microbiologiei clasice sau moderne în vederea identificării speciei microbiene şi stabilirii sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice.

Interpretarea rezultatelor hemoculturii

Având în vedere pe de o parte posibilitatea contaminării unei hemoculturi, iar pe de altă parte creşterea incidenţei hemoculturilor pozitive cu semnificaţie clinică în care sunt implicate microorganisme condiţionat patogene care fac parte din flora microbiană normală, rezultatele trebuie interpretate cu responsabilitate şi în echipă.

Există argumente bacteriologice (de ex. izolarea aceluiaşi microorganism din mai multe flacoane de hemocultură) şi clinice care permit medicilor infecţionişti în colaborare cu medicii microbiologi să stabilească etiologia microbiană (uneori polimicrobiană) a unei infecţii generalizate.

Fiind vorba de infecţii cu pronostic adesea rezervat, laboratorul are datoria să comunice rezultatele pe măsură ce acestea sunt obţinute (de ex. aspectul microscopic pe frotiul colorat Gram după tulburarea bulionului de cultură, aspecte microscopice şi culturale observate după dezvoltarea unor colonii, rezultatele antibiogramei nestandardizate etc, sau faptul că după o săptămână de observaţie nu se poate evidenţia multiplicarea microbiană) pentru ca să poată fi luate cele mai adecvate măsuri, în favoarea vindecării pacientului respectiv.

32. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *KLEBSIELLA*

Microorganismele din genul *Klebsiella* sunt enterobacterii imobile, nesporulate, caracterizate printr-o intensă activitate metabolică asupra hidraților de carbon pe care îi hidrolizează cu producere de acizi și uneori de gaz. Glucoza este degradată cu producere de gaz. Există mai multe specii de exemplu *Klebsiella pneumoniae, K. ozaenae, K. rhinoscleromatis* și *K. oxytoca. Klebsiella pneumoniae* este specia principală a genului și include bacili gram negativi, capsulați (capsula poate avea dimensiuni de 2-3 ori mai mari decât diametrul bacteriei).

Considerat inițial ca agent etiologic al pneumoniilor, s-a dovedit că numai 1-3 % din pneumonii (grave, necrotice și hemoragice, în special la pacienți cu un sistem de apărare deficitar) sunt produse de *Klebsiella pneumoniae.* Microorganismul, **condiționat patogen,** poate fi implicat într-o mare varietate de boli precum toxiinfecții alimentare de tip infecțios, infecții ale tractului respirator superior, infecții urinare etc. Din ce în ce mai frecvent *Klebsiella pneumoniae* este izolată în infecții nosocomiale (de spital), vezi și capitolul 23.

Cu toate că nu este cea mai reprezentativă entitate clinică, vom discuta în continuare diagnosticul pneumoniei produse de *Klebsiella pneumoniae.* Diagnosticul complet include elemente clinice, paraclinice și de laborator; diagnosticul bacteriologic fiind util în stabilirea etiologiei și tratamentului antibiotic corespunzător.

Diagnosticul de laborator microbiologic este bacteriologic, direct, incluzând următoarele etape.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientul să fi primit antibiotice, cât mai rapid și corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie și antisepsie etc). În infecțiile produse de *Klebsiella pneumoniae* se pot recolta materii fecale, urină, sânge, puroi etc. În continuare vom discuta cazul în care p.p. este reprezentat de spută (vezi și capitolul 6). Din punct de vedere **macroscopic**, sputa poate avea un aspect mucoid, de culoare roșu închis, „în jeleu de coacăze".

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat și transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) și respectiv Gram. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie și se notează prezența **celulelor** de la nivel alveolar (ex. macrofage alveolare), prezența **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite) și prezența **bacililor gram negativi,** de dimensiuni relativ mari, **încapsulați** (înconjurați de o capsulă voluminoasă). Examinarea microscopică trebuie să demonstreze **calitatea produsului patologic** și să realizeze o identificare prezumtivă a microorganismului implicat (vezi și capitolul 52). În colorația cu albastru de metilen, capsula apare ca un halou în jurul klebsielelor. Utilizând anticorpi anti-capsulari, se poate realiza o identificare rapidă inclusiv direct, pe produsul patologic, prin **reacția de umflare a capsulei** (vezi capitolul 12, punctul 12. 14).

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). *Klebsiella pneumoniae* se poate dezvolta pe medii de cultură obişnuite în 18-24 ore, la 35-37C. Se preferă utilizarea unor medii de cultură slab selective (ex. MacConkey). *Klebsiella pneumoniae* nu se dezvoltă pe medii înalt selective şi este parţial inhibată pe cele moderat selective. Pe mediile solide *Klebsiella pneumoniae* formează colonii **lactozo pozitive,** mari, de **tip M** bombate, cremoase, în „picătură de miere", care dau aspectul de „curgere" pe suprafaţa mediului de cultură, cu tendinţă de confluare. Se poate realiza şi inocularea la animale de laborator sensibile (şoarecele alb), vezi şi capitolul 11.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-negativi, cu dimensiuni mari, capsulaţi, capsula fiind voluminoasă, dispuşi în lanţuri scurte, perechi sau izolaţi. În mediul de cultură pot pierde capsula.
- Caractere de cultură: Produc colonii **lactozo pozitive,** de **tip M,** mari (2-3 mm la 24 de ore, peste 4 mm la 48 ore), bombate, vâscoase, cremoase, în „picătură de miere", care dau aspectul de „curgere" pe suprafaţa mediului de cultură, cu tendinţă la confluare.
- Caractere biochimice:
  - *Klebsiella* este un microorganism lactozo pozitiv, ceea ce se poate evidenţia încă din etapa de izolare pe mediul MacConkey.
- Alte caractere biochimice şi de mobilitate se studiază după repicarea unor colonii pe medii multi test (TSI, MIU), pe mediul Simmons sau în sisteme multi test comerciale de tip API.
  - *Klebsiella pneumoniae* este glucozo pozitivă (cu producere de gaz), lactozo pozitivă, nu produce H_2S, imobilă, urează pozitivă, indol negativă, care se dezvoltă folosind citratul ca unică sursă de carbon.
  - Produce acetoină, caracter evidenţiat prin reacţia Voges-Proskauer.
- Caractere antigenice:
  - Se utilizează seruri cu anticorpi cunoscuţi pentru identificarea tulpinilor de *Klebsiella*, prin tehnici de aglutinare, coaglutinare sau latex aglutinare. Există peste 80 de tipuri de antigen K la *Klebsiella pneumoniae.* Aceste reacţii se pot practica în laboratoare de referinţă.
- Caractere de patogenitate: Se poate utiliza inocularea la şoarecele alb (vezi capitolul 11).
- Alte caractere/teste utilizate în identificare care se pot utiliza (în centre de referinţă):
  - Testarea sensibilităţii la bacteriofagi (unele dintre scheme au fost stabilite în Institutul Cantacuzino)
  - Gruparea în funcţie de rezistenţa la antibiotice şi chimioterapice
  - Caractere testate prin metode ale biologiei moleculare (stabilirea spectrului plasmidic cu identificarea plasmidelor implicate în virulenţă etc).

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **este obligatorie** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice. Determinarea CMI şi CMB poate fi necesară (vezi capitolul 14).

33. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *PROTEUS*

Genul *Proteus* este format din germeni pleomorfi (de unde şi numele genului), foarte mobili, gram negativi, aerobi facultativ anaerobi, care nu fermentează lactoza, produc urează, produc fenil-alanin-dezaminază, sunt nesporulaţi, necapsulaţi. Există 2 specii principale, *Proteus mirabilis* şi *Proteus vulgaris*.

De regulă microorganismele din genul Proteus sunt implicate patogenic în afecţiuni ce apar în afara tractului digestiv (fac parte din flora microbiană intestinală). Există totuşi şi toxiinfecţii alimentare de tip infecţios cu *Proteus spp.* În mod frecvent se discută despre infecţiile tractului urinar (ITU), dar sunt posibile şi alte infecţii (tegumentare, genitale, cu alte localizări în cursul unei bacteriemii la pacienţi cu status imun deficitar sau în spital/ infecţii nosocomiale). Vom discuta în continuare diagnosticul de laborator al ITU.

Diagnosticul de laborator microbiologic este bacteriologic, direct, incluzând următoarele etape.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie etc). În infecţiile produse de *Proteus spp.* se pot recolta urină, puroi, diferite exsudate purulente, materii fecale, lichid de vărsătură, alimente, sânge etc. În continuare vom discuta cazul în care p.p. este reprezentat de **urină** (vezi şi capitolul 29). Din punct de vedere **macroscopic**, urina ar putea fi tulbure, purulentă. Transportul urinei trebuie realizat rapid, în maxim 30 minute, iar dacă această recomandare nu poate fi îndeplinită, p.p. trebuie transportat „la rece" (+ 4°C).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea unui preparat proaspăt între lamă şi lamelă, din sedimentul rezultat după centrifugarea urinei. Examenul microscopic al urinei este foarte important pentru că este uşor de realizat, este ieftin şi permite observarea unor elemente care orientează diagnosticul. Examinarea microscopică a urinei ar putea conduce la economii importante (de timp, reactivi şi materiale, medii de cultură); vezi şi capitolul 29. *Proteus spp.* prezintă un mare număr de cili peritrichi care conferă **mobilitatea** caracteristică (există şi tulpini aciliate). Se poate realiza şi un frotiu colorat Gram din urina omogenizată. Germenii au un **accentuat polimorfism** pe frotiu putându-se observa bacili, cocobacili, forme filamentoase de până la 30 μm. Sunt necapsulaţi şi nesporulaţi. Prezenţa a cel puţin 1 leucocit/câmp microscopic la examinarea cu obiectivul de imersie sugerează piuria, care într-un context clinic sugestiv ajută la definirea ITU. În cazul în care din urina omogenizată prelevăm cu ansa calibrată de 0,01 ml urină iar în frotiul rezultat identificăm cel puţin 1-2 bacterii/câmp (în microscopia optică cu imersie) acest rezultat sugerează prezenţa a 10^5 bacterii (unităţi formatoare de colonii)/ml şi respectiv infecţia tractului urinar.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic trebuie realizată în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Cresc pe medii simple inclusiv pe medii peptonate lichide cu degajarea unui miros caracteristic de putrefacţie. Suportă mari variaţii de temperatură şi de pH. Este necesară realizarea uroculturii cantitative şi demonstrarea prezenţei a peste 10^5 bacterii/ml de urină. Pe mediile simple uzuale, pe agar-sânge, pe AABTL etc, nu se pot obţine colonii izolate, fiind cunoscut **fenomenul de invazie** (vezi şi capitolul 11). Acest aspect sugerează prezenţa *Proteus spp.* în produsul patologic. „Fenomenul" poate fi inhibat dacă se realizează însămânţarea p.p. pe medii selectivo-diferenţiale (ex. Mac Conkey sau ADCL). Pe aceste medii *Proteus spp.* produce colonii lactozo negative, de tip S.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-negativi, cu un accentuat polimorfism (bacili, cocobacili, forme filamentoase de până la 30 μm), necapsulaţi şi nesporulaţi.
- Caractere de cultură:
  - Fenomenul de invazie: reprezintă un caracter de identificare preliminară pentru *Proteus spp.*, o bacterie foarte mobilă; dacă însămânţăm o tulpină care aparţine acestui gen la periferia unei plăci Petri cu mediu simplu (agarizat 2%), de la locul însămânţării cultura se „dezvoltă în valuri concentrice" (se întinde în aproape în aproape) pe toată suprafaţa mediului
  - Pe anumite medii selective, invazia este inhibată şi se pot obţine colonii izolate (adăugăm la mediul de cultură acizi sau săruri biliare, tiosulfat de sodiu etc); aceste colonii sunt **lactozo negative** şi de **tip S**
  - Fenomenul „liniei de demarcaţie", reprezintă un caracter util în studii epidemiologice, în cazul în care tulpinile implicate aparţin genului *Proteus;* dacă pe o placă cu mediu solid cultivăm 2 tulpini diferite, în 2 puncte opuse, tulpinile se vor dezvolta invadând până la un punct în apropierea liniei de întâlnire, unde se va crea o „linie de demarcaţie" între cele 2 tulpini (distanţă de 1-2 milimetri); dacă tulpinile nu sunt diferite va avea loc „creşterea în valuri" fără „demarcaţie" cu dezvoltarea unei „pânze de cultură" continue
  - Fenomenul de „cățărare", reprezintă o variantă de izolare în cultură pură a unei tulpini de *Proteus:* cultivarea unui produs patologic în lichidul de condens al unui tub cu geloză înclinată incubat în poziţie verticală va conduce (în cazul în care în p. p. există o tulpină de *Proteus spp.)* la obţinerea în 24 ore a unei culturi pure de *Proteus,* care se va dezvolta „în valuri suprapuse" până la partea superioară a mediului de cultură.
- Caractere biochimice:
  - *Proteus spp.* include microorganisme lactozo negative.
- Alte caractere biochimice şi de mobilitate se studiază după repicarea unor colonii pe medii multi test (TSI, MIU), pe mediul Simmons sau în sisteme multi test comerciale; *Proteus spp.* este glucozo pozitiv (uneori cu producere de gaz), lactozo negativ, produce H_2S, mobil, urează pozitiv, se poate dezvolta folosind citratul ca unică sursă de carbon.

- *Proteus spp.* produce fenil-alanin-dezaminază.
- *Proteus mirabilis* este indol negativ şi ornitin decarboxilază pozitiv în timp ce *Proteus vulgaris* este indol pozitiv şi ornitin decarboxilază negativ.

- Caractere antigenice:
  - Se utilizează seruri cu anticorpi cunoscuţi (anti-O şi anti-H) pentru identificarea tulpinilor de *Proteus*, prin tehnici de aglutinare (la nivelul laboratoarelor de referinţă).
- Alte caractere/teste utilizate în identificare (în centre de referinţă):
  - Testarea sensibilităţii la bacteriofagi.
  - Gruparea în funcţie de rezistenţa la antibiotice şi chimioterapice.

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) este **obligatorie** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice. Determinarea CMI şi CMB poate fi necesară (vezi capitolul 14).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

34. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *YERSINIA*

Genul *Yersinia* include 11 specii dintre care *Yersinia pestis* (cauza ciumei), *Y. pseudotuberculosis* şi *Y. enterocolitica* produc infecţii umane. Sunt enterobacterii de dimensiuni mici, cu aspect de bacili sau cocobacili gram negativi, care prezintă coloraţie bipolară. În produsul patologic prezintă un pleomorfism accentuat. Nu formează spori, pot prezenta structuri de tip capsular. Sunt aerobi facultativ anaerobi, catalazo-pozitivi, oxidazo-negativi. Cresc pe medii simple şi produc colonii de tip S în 24-48 de ore; ultimele 2 specii sunt mobile la 22-30°C.

În continuare vom discuta despre yersiniozele cu poartă de intrare digestivă, care pot avea drept agenţi etiologici *Y. enterocolitica* sau *Y. pseudotuberculosis*. *Y. enterocolitica* reprezintă o cauză destul de frecventă a BDA, cel puţin din datele prezentate în literatura de specialitate internaţională. Poate determina infecţii cu caracter invaziv localizate pe ileonul terminal, cu „prinderea" ganglionilor mezenterici şi apariţia unor dureri în fosa iliacă dreaptă ceea ce poate conduce la punerea eronată a diagnosticului de apendicită acută, mai ales la copii. În cazul adulţilor s-a dovedit implicarea *Y. enterocolitica* în declanşarea unor artrite reactive sau a eritemului nodos cu dificultăţi în ceea ce priveşte diagnosticul diferenţial. La pacienţii cu variate grade de imunodepresie boala enterică poate fi urmată de manifestări extra-intestinale, uneori în cadrul unei infecţii generalizate. Bolile produse de *Y. pseudotuberculosis* au o incidenţă mai redusă; pot apărea enterite subacute, adenopatie mezenterică etc.

Diagnosticul de laborator în yersiniozele cu poartă de intrare digestivă este bacteriologic, direct. În cazul manifestărilor extra-intestinale poate fi util diagnosticul serologic.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii şi înainte de iniţierea antibioterapiei. Produsul patologic poate fi reprezentat de **materii fecale,** ganglioni recoltaţi intraoperator, sânge etc. În continuare vom discuta diagnosticul unei BDA. Se poate folosi mediul de transport Cary-Blair.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea unui preparat proaspăt între lamă şi lamelă (nu se efectuează frotiuri din materiile fecale). Preparatul se examinează la microscopul optic cu obiectivul 40×. Vom evidenţia prezenţa celulelor inflamatorii.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). În vederea izolării *Y. pseudotuberculosis* sau *Y. enterocolitica* se pot utiliza diferite medii selective clasice (MacConkey, ADCL) sau mediul CIN (cefsulodină, irgasan, novobiocină), eventual cu incubare la temperatura camerei (20-30°C). Există diferite metode

de îmbogăţire, de ex. inocularea p.p. în tampon fosfat salin cu incubare la 4°C timp de 1-3 săptămâni urmată de treceri pe mediile menţionate mai sus. Coloniile suspecte se repică pe mediile multitest clasice sau pe galerii API.

4. Identificarea se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt cocobacili sau bacili gram-negativi cu dimensiuni de 0,5-3 µm/1-2 µm, posibil pleomorfi
- Caractere de cultură:
  - Produc colonii de tip S, de 1-1,5 mm (2-3 mm după 48 ore)
  - Pe mediul CIN coloniile sunt semitransparente, cu margini clare şi centrul roşu
- Caractere biochimice şi de mobilitate:
  - se pot investiga folosind mediile multi-test clasice sau galeriile API
  - fermentează glucoza fără producere de gaz, nu fermentează lactoza, nu produc H_2S
  - sunt imobile la 37°C şi mobile la 22°C, nu produc indol, produc urează
- Caractere antigenice:
  - se utilizează seruri specifice anti-*Yersinia*, prin reacţii de aglutinare pe lamă
- Testarea sensibilităţii la bacteriofagi (lizotipia) se poate utiliza în studii epidemiologice sau în scop de cercetare, fiind rezervată laboratoarelor de referinţă
- Alte caractere/teste utilizate în identificare la nivelul centrelor de referinţă:
  - teste biochimice suplimentare
  - reacţii de aglutinare cu alte seruri imune, pentru tipuri mai puţin frecvent întâlnite
  - bacteriocinotipia
  - tehnici ale biologiei moleculare (digestia endonucleazică a ADN-ului cromozomial, electroforeza în câmp pulsatil, ribotipia, PCR etc).

5. Este recomandată realizarea antibiogramei (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice), prin metoda difuzimetrică standardizată. Se pot utiliza şi sisteme automate, de exemplu trusa automată **ATB G–5**, cu citire şi interpretare după 18-24 ore de incubare (21 antibiotice), pentru bacili Gram negativi.

Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic este util în determinarea etiologiei artritelor reactive, eritemului nodos sau în cazul altor manifestări extra-intestinale. Anticorpii apar la circa 4-7 zile de la debutul bolii, ating valoarea maximă după circa 14 zile şi persistă câteva luni. Se pot practica diferite tehnici, de ex. reacţia de aglutinare în tuburi. Se consideră că valoarea titrului semnificativ este ≥ 1/160. Este recomandată testarea serurilor pereche, în dinamică.

Trebuie să fie luată în considerare posibilitatea apariţia unor reacţii încrucişate, datorită existenţei unor antigene asemănătoare la microorganisme din genurile *Brucella* sau *Salmonella*.

35. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *PSEUDOMONAS*

Genul *Pseudomonas* face parte din familia Pseudomonodaceae şi include mai multe specii. *Pseudomonas aeruginosa* (bacilul piocianic, „bacilul puroiului albastru") reprezintă specia cea mai importantă a genului, relativ frecvent implicată în infecţii la persoane cu reactivitate scăzută, precum şi în infecţii nosocomiale (infecţii „de spital"). Sunt bacili gram-negativi aerobi, oxidazo pozitivi, nesporulaţi, cu dimensiuni de 1-5 μm/0,5-1 μm, mobili datorită prezenţei unuia sau mai multor flageli (polari).

Datorită capacităţii de adaptare şi supravieţuire în diferite medii, precum şi datorită factorilor de virulenţă pe care îi deţine, *Pseudomonas aeruginosa* poate produce infecţii foarte variate, de la infecţii tegumentare superficiale până la stări de sepsis cu evoluţie fulminantă. Prezenţa piocianicului ar putea fi semnalată de culoarea albastră verzuie a pansamentelor. La persoanele cu reactivitate normală, infecţiile sunt de obicei localizate (foliculite, otite, infecţii oculare etc). La nivel dermic, procesul infecţios poate avea şi o evoluţie gravă, cu apariţia de vezicule care se sparg şi se refac pe o bază necrotică; procesul poate progresa în profunzime *(ecthyma gangrenosum).*

La persoanele spitalizate, cu reactivitate diminuată şi supuse unor manevre medico-chirurgicale invazive (intubaţii, cateterizări etc) precum şi la persoanele cu arsuri, *Pseudomonas aeruginosa* poate produce infecţii localizate, dar potenţialul diseminării şi apariţiei unor complicaţii grave (bacteriemie, osteomielită, meningită, endocardită, sepsis) este foarte important. În lipsa tratamentului adecvat (dificil datorită rezistenţei la antibiotice), evoluţia procesului infecţios poate fi gravă sau deosebit de gravă. Un fenotip particular al speciei *Pseudomonas aeruginosa* produce o infecţie pulmonară cronică la pacienţii cu fibroză chistică (mucoviscidoză). Dintre entităţile clinice menţionate mai sus, din punct de vedere al diagnosticului de laborator vom discuta infecţiile supurative ale tegumentelor şi mucoaselor.

Diagnosticul de laborator este numai bacteriologic, direct, cu următoarele etape.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie etc). În continuare vom discuta cazul în care p.p. este reprezentat de **puroi** (vezi şi capitolul 6). Puroiul trebuie examinat **macroscopic**, deoarece poate avea un aspect sugestiv (culoare albastră sau galben-verzui fluorescentă).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie şi se notează prezenţa **celulelor** de la nivel tegumentar (eventual modificate faţă de normal), prezenţa **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite, piocite) şi prezenţa **bacililor gram-negativi** cu cu dimensiuni de 1-5 μm/ 0,5-1 μm, dispuşi în lanţuri scurte, perechi, izolaţi.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). *Pseudomonas aeruginosa* se poate dezvolta pe medii de cultură obişnuite în 18-24 ore, la 5-42°C, cu dezvoltare optimă la 30-37°C. Se preferă utilizarea unor medii de cultură selective. Uneori cultivarea se realizează pe agar-sânge. Pe mediile solide *Pseudomonas aeruginosa* formează **colonii** de tip S **care se pigmentează** în mod specific, însoţindu-se de **pigmentarea mediului** (albastru sau galben-verde fluorescent). De menţionat că pot apărea colonii (de tip S) cu aspecte diferite, dând impresia prezenţei concomitente a unor bacterii diferite. Cultura poate avea un miros aromat, ca al florilor de tei sau iasomie. Pe agar-sânge produce hemoliză. În medii lichide, *Pseudomonas aeruginosa* tulbură mediul însă în timp duce la apariţia unei „membrane" aderentă, cenuşie, la suprafaţa acestuia. După 18-24 de ore, sub „membrană" se poate evidenţia prezenţa pigmentului produs.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-negativi cu cu dimensiuni de 1-5 µm/ 0,5-1 µm, dispuşi în lanţuri scurte, perechi, izolaţi, relativ polimorfi. În culturi mai vechi pot apărea diferite forme (filamentoase, cocoide). Mobilitatea se poate examina pe preparatul proaspăt, între lamă şi lamelă.
- Caractere de cultură:
  - Produc colonii de tip S **care se pigmentează** în mod specific, însoţindu-se de **pigmentarea mediului** (albastru sau galben-verde fluorescent). Pot apărea colonii (de tip S) cu aspecte diferite, dând impresia prezenţei concomitente a unor bacterii diferite. Coloniile pot prezenta o suprafaţă iridescentă, cu luciu metalic şi plaje de autoliză, degajând o aromă pătrunzătoare particulară. Pentru stimularea sintezei pigmenţilor se poate folosi repicarea pe medii speciale, King F (stimulează producerea de fluoresceină) şi King P (stimulează producerea de piocianină).
  - Cultura poate avea un miros aromat, ca al florilor de tei sau iasomie.
  - Pe mediile cu sânge produc hemoliză.
  - Multiplicarea la 42°C poate fi utilă pentru identificare.
- Caractere biochimice:
  - Produce diferiţi pigmenţi, dintre care mai importanţi sunt piocianina (albastru) şi pioverdina sau fluoresceina (galben-verzui fluorescent).
  - Este un germen catalazo pozitiv care degradează oxidativ glucoza şi nu fermentează lactoza (atât coloana cât şi panta mediului TSI au culoare roşie).
  - Se poate realiza testul de oxidare-fermentare a glucozei.
  - Bacilul piocianic este oxidazo pozitiv (vezi capitolul 12).
  - Pentru studii mai aprofundate, în momentul actual anumite laboratoare utilizează sisteme comerciale care verifică în acelaşi timp numeroase caractere biochimice permiţând nu numai încadrarea în genul *Pseudomonas*, dar şi identificarea precisă a speciei (de exemplu Rapid NTF, cu identificarea speciei în 4-48 de ore).
- Caractere de patogenitate:

- Se pot studia în anumite situaţii (inoculăm 4 şoareci cu cantităţi fixe de germeni cultivaţi pe geloză înclinată 2% şi urmărim supravieţuirea acestora timp de patru zile).
- Alte teste ce pot fi studiate în scopul identificării germenilor:
  - Testarea caracterelor antigenice
  - Testarea sensibilităţii la bacteriofagi (lizotipia) şi respectiv piocinopia se pot utiliza în studii epidemiologice sau în scop de cercetare, fiind rezervate laboratoarelor de referinţă
  - Teste de biologie moleculară (sonde nucleotidice, analiza ADN după utilizarea de endonucleaze de restricţie, PCR).

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **este obligatorie** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice. *Pseudomonas aeruginosa* reprezintă unul dintre microorganismele care pot crea dificultăţi deosebit de mari în alegerea tratamentului etiologic, datorită rezistenţei la foarte multe dintre antibioticele uzuale. Cu toate că anumiţi autori indică faptul că bacilul piocianic ar fi sensibil la mezlocilină, ticarcilină, ticarcilină-acid clavulanic, piperacilină, piperacilină-tazobactam, imipenem, aztreonam, anumite aminoglicozide, fluorochinolone sau cefalosporine de generaţia a III-a, considerăm că principiul care trebuie reţinut este că în orice infecţie cu *Pseudomonas aeruginosa* (atunci când s-a dovedit că acest microorganism este agentul etiologic al infecţiei) antibiograma este obligatorie. În cazul unor infecţii grave antibiograma difuzimetrică trebuie să fie însoţită de alte determinări (vezi capitolul 14).

BCU IAŞI CENTRAL LIBRARY

36. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *VIBRIO*

Genul *Vibrio* include mai multe specii dintre care 12 sunt potenţial patogene pentru om. Vibrionii sunt bacili gram-negativi, drepţi sau uşor încurbaţi, foarte mobili, necapsulaţi, nesporulaţi. Specia principală este reprezentată de *Vibrio cholerae* (vibrionul holeric), aerob facultativ anaerob, oxidazo pozitiv, rezistent la pH alcalin şi săruri biliare. Vibrionul holeric produce o enterotoxină şi determină holera.

În condiţii naturale vibrionul holeric este patogen numai pentru om. Doza infectantă este de 10^8–10^{10} microorganisme. Holera nu este o boală invazivă. Germenii nu ajung în torentul circulator ci rămân cantonaţi la nivelul tractului intestinal; colonizează marginea în perie a celulelor epiteliale, se multiplică şi eliberează toxina holerică. După o perioadă de incubaţie de 1–4 zile apar brusc greaţă, vărsături, diaree abundentă (20-30 litri/zi) şi crampe abdominale. Scaunele apoase, riziforme („apă de orez") conţin mucus, celule epiteliale şi un mare număr de vibrioni. Există o pierdere rapidă de fluide şi electroliţi care duce la deshidratare, colaps circulator şi anurie. Rata mortalităţii în lipsa tratamentului este 25-50%.

Diagnosticul de laborator în holeră este bacteriologic, direct, trebuie realizat cât mai rapid posibil (urgenţă din punct de vedere epidemiologic) şi include etapele cunoscute.

Diagnosticul unui caz grav de holeră este uşor de realizat, în special în contextul unei epidemii. Cu toate acestea, cazurile uşoare sau cazurile izolate sunt relativ dificil de diferenţiat de alte boli diareice acute.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii şi înainte de iniţierea antibioterapiei. Produsul patologic este reprezentat cel mai frecvent de **materii fecale,** dar s-ar putea recolta şi lichid de vărsătură. Din punct de vedere **macroscopic** materiile fecale sunt apoase, riziforme („apă de orez"), de culoare verzuie, cu miros fetid, conţin flocoane de mucus. Transportul trebuie să fie realizat rapid, în maxim 1-3 ore. Se poate folosi ca mediu de transport mediul bacteriostatic Cary-Blair. Mediul **apă peptonată alcalină** (pH 9-9,5) poate fi utilizat atât în calitate de mediu de transport cât şi de mediu de îmbogăţire.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea unui preparat proaspăt între lamă şi lamelă (nu se efectuează frotiuri din produsul patologic). Preparatul se examinează la microscopul optic cu obiectivul 40×. Esenţial este faptul că nu se evidenţiază prezenţa leucocitelor. Vibrionii sunt în număr mare şi prezintă mişcări active, de rostogolire sau mişcări haotice. Suplimentar, p.p. ar putea fi „tratat" cu Ac specifici; dacă mobilitatea este stopată, se confirmă diagnosticul.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Abordarea diagnosticului de holeră se realizează în mod diferenţiat, respectiv prezumtiv (la nivelul unui laborator periferic) şi de certitudine (la nivelul laboratorului de referinţă). Este recomandată utilizarea atât a unui mediu moderat selectiv (ex. Bile Salts Agar/BSA) cât şi a unui mediu înalt selectiv (ex. Thiosulphate-Citrate-Bile salts-Sucrose/ TCBS).

Luând în considerare situaţia în care se ridică suspiciunea unei infecţii cu *V. cholerae* se recomandă însămânţarea p.p., direct sau după transportul în mediul Cary Blair, în apă peptonată alcalină (APA). După incubare pentru o durată de 6-8 ore la 35-37°C, facem trecerea pe mediul selectiv (TCBS şi/sau BSA) luând 2 anse de la suprafaţa APA (în acest interval, la suprafaţa APA poate să apară un „văl", respectiv cultura de vibrioni).

Examenul microscopic al „vălului" (preparat proaspăt, între lamă şi lamelă: vibrioni foarte mobili, cu mişcări de rostogolire sau haotice) precum şi utilizarea unor anticorpi specifici (reacţie antigen-anticorp) pot grăbi diagnosticul.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-negativi cu cu dimensiuni de 1-3 μm/ 0,5-0,8 μm
- Caractere de cultură:
  - Produc colonii de tip S, galbene, mari, cu diametrul de 2-4 mm (pe TCBS)
  - Pe mediul BSA, *V. cholerae* produce colonii de tip S rotunde, strălucitoare, transparente ca picăturile de rouă (spre deosebire de coloniile de *E. coli* care sunt mate).
- Caractere biochimice:
  - *V. cholerae* este oxidazo pozitiv (vezi capitolul 12)
  - alte teste biochimice, prin metode clasice sau utilizând galeriile manuale sau automate (ex. API 20E, ID 32E), se efectuează la nivelul unui laborator de nivel superior sau la nivelul centrului naţional de referinţă; testele biochimice pot diferenţia biotipul clasic de biotipul El Tor (se apreciază că *V. cholerae* O:139 este un mutant al biotipului El Tor)
- Testul „şuviţei" de ADN se poate utiliza pentru a diferenţia tulpini care sunt oxidazo-pozitive şi formează colonii cu aspect asemănător *(V. cholerae* şi *Aeromonas spp.);* în acest scop suspensionăm o colonie suspectă într-o picătură de soluţie 0,5% dezoxicolat de sodiu, pe o lamă de microscop. În cazul în care este vorba de o colonie de vibrioni, aceştia sunt lizaţi şi eliberează ADN-ul care poate fi „tras" cu ansa ca o şuviţă
- Caractere antigenice:
  - Se utilizează ser anti-holeric O:1 şi se practică reacţia de aglutinare pe lamă. La nivelul centrului de referinţă se confirmă reacţia pozitivă şi se identifică serotipul (Ogawa, Inaba sau Hikojima), iar în cazul unei reacţii negative se realizează o reacţie de aglutinare pe lamă folosind ser anti-holeric O:139
  - Testarea sensibilităţii la bacteriofagi (lizotipia) se poate utiliza în studii epidemiologice sau în scop de cercetare, fiind rezervată laboratoarelor de referinţă. Există sisteme de lizotipare care definesc peste 140 de lizotipuri diferite.
- Alte caractere/teste utilizate în identificare la nivelul centrelor de referinţă:
  - testul sensibilităţii la agentul vibriostatic cu O/129 (10 μg şi 50 μg)
  - determinarea toxinogenezei tulpinilor de *V. cholerae* prin reacţia VET-RPLA (latex aglutinare pasivă inversată)
  - tehnici de tip ELISA pentru identificarea unor structuri caracteristice *V. cholerae*
  - tehnici ale biologiei moleculare (ribotipie, PCR etc).

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice) se realizează prin metoda difuzimetrică standardizată, în special în scopul supravegherii apariţiei unor tulpini rezistente la medicamentele antimicrobiene.

37. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *HAEMOPHILUS*

Microorganismele din genul *Haemophilus* sunt cocobacili polimorfi, imobili, nesporulați, gram negativi, aerobi, facultativ anaerobi. Sunt germeni pretențioși; pentru a se dezvolta au nevoie de prezența factorilor de creștere prezenți în sânge (de unde și numele genului). Există mai multe specii, dintre care cele mai cunoscute sunt *Haemophilus influenzae* și *Haemophilus ducreyi;* multe dintre tulpinile de *H. influenzae* sunt capsulate.

Haemophilus influenzae

Haemophilus influenzae este patogen prin multiplicare și invazivitate. Microorganismul pătrunde pe cale respiratorie. Boala debutează ca o rinofaringită acută, probabil în asociere cu o infecție virală la nivelul tractului respirator. Aceasta poate fi urmată de epiglotită, laringotraheită, otită, sinuzită, mai rar de pneumonie dar și de celulită sau de meningită acută purulentă la copiii mici preșcolari. Sinusurile sau urechea medie pot fi afectate prin extensie locală (se poate nota faptul că *Haemophilus influenzae* tip b și pneumococul se numără printre agenții etiologici foarte comuni ai otitei medii bacteriene și ai sinuzitelor acute). Dacă microorganismul pătrunde în torentul sanguin, pe această cale poate infecta meningele. Ocazional infecția cu *H. influenzae* poate duce la o laringotraheită obstructivă fulminantă care necesită traheotomie sau intubare promptă a copilului respectiv. În vederea discutării examenului de laborator vom avea în vedere meningita produsă de *H. influenzae.*

Diagnosticul de laborator microbiologic în infecțiile cu *Haemophilus influenzae* este bacteriologic, direct, incluzând etapele care vor fi prezentate în continuare.

În **meningita** produsă de *H. influenzae* diagnosticul este **urgent** (risc de evoluție cu sechele și/sau deces), de importanță maximă fiind recoltarea și transportul rapid al LCR către laborator. Este de preferat realizarea unei cultivări „la patul bolnavului", chiar dacă pentru concentrarea germenilor ar putea fi necesară centrifugarea LCR. Analiza citologică și biochimică a LCR este utilă în stabilirea etiologiei.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid și corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie și antisepsie etc). În infecțiile produse de *Haemophilus influenzae* se pot recolta secreții de la nivelul tractului respirator superior sau inferior, secreții din sfera ORL, lichide recoltate prin puncție, sânge, LCR etc. În continuare vom discuta cazul în care p.p. este reprezentat de LCR (vezi și capitolul 6). Așa cum am mai menționat, **recoltarea LCR** prin puncție (după verificarea presiunii din artera centrală a retinei prin examinarea fundului de ochi) trebuie făcută pe cât posibil la patul bolnavului, având la dispoziție tot ce este necesar pentru pregătirea frotiurilor, cultivarea pe diferite medii de cultură, repartizarea unei cantități de LCR pentru examenul citologic și biochimic (vezi și capitolul 6). În cazul în care

p.p. urmează a fi transportat către laborator, transportul trebuie realizat fără întârziere (la o temperatură apropiată de 37°C, refrigerarea este contraindicată). *H. influenzae* ar putea fi izolat şi prin hemocultură, cultivarea secreţiilor nazale sau faringiene etc. Din punct de vedere **macroscopic**, LCR poate avea aspect purulent.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Dacă LCR este franc purulent frotiurile se pot executa direct din p.p., în caz contrar realizăm iniţial centrifugarea LCR. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie şi se notează prezenţa **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite) şi prezenţa **cocobacililor gram- negativi,** fini, capsulaţi, dispuşi separat sau în grămezi „aranjate în aceeaşi direcţie", uneori dispuşi în lanţuri scurte, situaţi intra sau extraleucocitar. Datorită faptului că aceste microorganisme se colorează relativ slab în coloraţia Gram ar putea fi necesară colorarea frotiului de rezervă printr-o altă metodă sau, recolorarea prelungită cu fucsină.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). *Haemophilus influenzae* este un microorganism foarte pretenţios care **nu** se poate dezvolta pe medii de cultură obişnuite. Unele tulpini de *Haemophilus influenzae* necesită pentru iniţierea creşterii 5-10% CO_2. Este necesară pentru incubare o atmosferă umedă, la 35-37°C, şi o durată de minim 24-48 de ore. Pentru cultivare sunt necesari factori de creştere precum hemina (factor X) şi factorul V care poate fi înlocuit prin NAD, NADP sau alte coenzime. Ambii factori se obţin din eritrocite, însă este necesară eliberarea conţinutului acestora în mediu (de exemplu prin căldură, sau prin digestie peptică). Factorul V este sintetizat şi de stafilococul auriu, astfel că pe geloză sânge coloniile de *Haemophilus influenzae* sunt mai numeroase şi de dimensiuni mai mari în apropierea unei linii pe care a fost însamânţată o tulpină hemolitică de *Staphylococcus aureus* (fenomenul de satelitism). Coloniile sunt de tip S sau M şi ating un diametru de 0,5-0,8 mm după 24 de ore, respectiv 1-2 mm la 48 de ore, având aspectul unor picături de rouă pe geloză chocolat. Pe geloză-sânge cu infuzie de inimă-creier apar colonii mici, rotunde, convexe, de tip S, care în primele 24 ore prezintă irizaţii puternice, caracteristice. Nu apare hemoliză.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt cocobacili gram negativi, mici (1-1,5 µm/0,3 µm), dispuşi separat sau în grămezi, uneori dispuşi în lanţuri scurte. În medii complexe, la 6-8 ore, predomină formele cocobacilare, care au şi capsulă. În culturile vechi se caracterizează prin pleomorfism şi pierderea capsulei (dificultăţi de diagnostic diferenţial microbiologic).
- Caractere de cultură: Produc coloniile de tip S sau M care ating un diametru de 0,5-0,8 mm după 24 de ore, respectiv 1-2 mm la 48 de ore, având pe geloză chocolat aspectul unor picături de rouă. Necesită prezenţa în mediul de cultură a factorilor de creştere (X şi V). Factorul V este sintetizat şi de stafilococul auriu, astfel că pe geloză sânge coloniile de *Haemophilus influenzae* sunt mai numeroase şi de dimensiuni mai mari în apropierea unei linii pe care a fost însămânţată o tulpină hemolitică de *Staphylococcus aureus* (fenomenul

de satelitism). Pe geloză-sânge cu infuzie de inimă-creier apar colonii mici, rotunde, convexe, de tip S, care în primele 24 ore prezintă irizaţii puternice, caracteristice. Nu apare hemoliză.

- Caractere biochimice:
  - Majoritatea tulpinilor (70%) sunt indol pozitive (transformă triptofanul în indol).
  - Fermentează inconstant diferiţi carbohidraţii. Pe baza unor teste biochimice specia a putut fi împărţită în biotipuri.
  - Utilizând galeria API NH (manuală) putem identifica specii de *Neisseria, Haemophilus* şi *Branhamella catarrhalis*, în numai 4 ore.
- Caractere antigenice:
  - Se utilizează seruri cu anticorpi cunoscuţi pentru identificarea tulpinilor de *Haemophilus influenzae*, prin tehnici imunologice, în funcţie de Ag K. Tipurile (a-f) se pot diferenţia prin reacţii de umflare a capsulei şi de imunofluorescenţă.
  - Tulpinile capsulate (Ag K) se pot identifica în p.p. (LCR sau urină după centrifugare) prin contraimunoelectroforeză, latex aglutinare sau ELISA.
  - Tulpinile necapsulate se pot identifica şi tipiza prin Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE).
- Alte teste: există sonde nucleotidice produse comercial pentru identificarea *H. influenzae.*

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **este necesară** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice. Este recomandată utilizarea unui mediu special, respectiv *Haemophilus* test medium (HTM). Se pot utiliza şi truse automate pentru testare (ex. ATB HAEMO cu citire şi interpretare după 18-24 ore sau rapid ATB E 4 cu citire şi interpretare după 4-5 ore incubare). Determinarea CMI şi CMB poate fi necesară şi se realizează prin metode clasice sau cu ajutorul testului E (vezi capitolul 14).

Identificarea răspunsului imun faţă de *Haemophilus influenzae*

Identificarea prezenţei de anticorpi faţă de *H. influenzae* ar putea fi utilă pentru verificarea răspunsului imun în urma vaccinării. În acest scop au fost utilizate RIA şi ELISA.

Haemophilus ducreyi

Haemophilus ducreyi este strict patogen pentru specia umană fiind agentul patogen al unei boli cu transmitere sexuală, şancrul moale. În regiunea genitală apare şancrul moale (iniţial se formează o papulă sensibilă, cu eritem în jur, urmată de apariţia unei pustule şi apoi a unei eroziuni care ulcerează), dureros, cu eritem şi edem. Pot exista şancre multiple. Ganglionii regionali sunt măriţi, dureroşi şi pot supura. Diagnosticul diferenţial se face cu sifilisul, infecţia cu virusul *Herpes simplex* şi limfogranulomatoza veneriană.

Diagnosticul de laborator este în special microbiologic (bacteriologic, direct).

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de

asepsie şi antisepsie etc). În infecţiile produse de *Haemophilus ducreyi* se pot recolta secreţii de la nivel genital (raclarea secreţiei de sub marginea şancrului, puroi din abces etc).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Putem vizualiza intra sau extra celular bacili de dimensiuni mici, pleomorfi, gram negativi, dispuşi în perechi sau lanţuri paralele (în şiruri), frecvent în asociere cu alte microorganisme. Se pot colora bipolar.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Cultivarea *H. ducreyi* este dificilă. Necesită pentru cultivare factorul X. Se poate dezvolta dacă produsul patologic este recoltat de la baza şancrului şi cultivat pe geloză chocolat plus vancomicină 3 μg/ml la 33°C în atmosferă de 5-10% CO_2.

4. Identificarea microorganismului se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili de dimensiuni mici, pleomorfi, gram negativi, dispuşi în perechi sau lanţuri paralele. Se pot colora bipolar.
- Caractere de cultură: Produc coloniile de tip S de dimensiuni mici, după 3-7 zile de la cultivare. Pe geloză-sânge pot produce hemoliză.
- Caractere biochimice:
  - Necesită prezenţa în mediul de cultură a factorului de creştere (X).
  - *Haemophilus ducreyi* este catalazo negativ.

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **este necesară** şi poate realiza prin metode difuzimetrice.

Diagnosticul de laborator imunologic

Şancrul moale este singura afecţiune produsă de microorganisme din genul *Haemophilus* în care **diagnosticul serologic** ar putea fi util. Identificare prezenţei anticorpilor este utilă şi în scop epidemiologic. Se pot utiliza tehnici de tip ELISA pentru identificarea anticorpilor IgG sau IgM care apar faţă de *H. ducreyi.*

Este încă în discuţie utilitatea IDR cu Ag extrase din cultură de bacili Ducreyi.

38. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *BORDETELLA*

Microorganismele din genul *Bordetella* sunt cocobacili polimorfi, imobili, nesporulați, capsulați, gram negativi, asemănători celor din genul *Haemophilus*, strict aerobi. Specia tip este reprezentată de *B. pertussis* agentul etiologic al tusei convulsive; alte exemple sunt reprezentate de *Bordetella parapertussis* și *Bordetella bronchiseptica*. Sunt germeni pretențioși; pentru a se dezvolta au nevoie de medii de cultură îmbogățite.

Bordetella pertussis

Bordetella pertussis este patogenă numai pentru om. Transmiterea se realizează în special pe cale aeriană (picături Pflügge) într-un acces de tuse. Contagiozitatea este maximă în primul stadiu de boală și la începutul stadiului al doilea (de tuse paroxistică). Microorganismul aderă, se multiplică rapid, interferă cu activitatea mucociliară normală, apar primele manifestări clinice care se agravează treptat. Substanțele toxice elaborate (și în special toxina pertussis/TP) au următoarele acțiuni: TP conduce la hipoglicemie, sensibilizare la histamină, reducerea activității macrofagelor, diminuarea răspunsului imun umoral (sinteza de anticorpi); adenilatciclaza pertussis diminuă activitatea fagocitară a macrofagelor și leucocitelor; toxina letală produce necroze locale, citotoxina traheală are efect citotoxic pe celulele ciliate etc.

Diagnosticul de laborator microbiologic în infecțiile cu *Bordetella pertussis* este bacteriologic, direct; diagnosticul serologic este tardiv și ar putea fi util pentru un diagnosticul diferențial (post-factum) sau în scop epidemiologic.

Diagnosticul etiologic este foarte util în primul stadiu al tusei convulsive (pacientul este foarte contagios iar evoluția bolii poate fi influențată pozitiv prin administrarea de antibiotice); identificarea *B. pertussis* la persoanele asimptomatice și respectiv la contacți ar permite aplicarea unor măsuri preventive.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid și corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie și antisepsie etc). În infecțiile produse de *Bordetella pertussis* se pot recolta secreții de la nivelul tractului respirator superior (nazal, faringian); vom realiza recoltarea cu ajutorul **tamponului din alginat de calciu** care se lasă pe loc 30-60 de secunde pentru a favoriza adsorbția *B. pertussis* (bumbacul inhibă dezvoltarea microorganismelor) sau prin aspirarea secreților traheobronșice. Este descrisă și metoda „plăcilor tușite" (se expune o placă Petri cu mediul Bordet-Gengou la care s-a adăugat antibiotic, deschisă, la aproximativ 20 cm în fața gurii bolnavului în timpul accesului de tuse). Este recomandată prelucrarea imediată a p.p., dacă este posibil la patul bolnavului (microorganismul fiind foarte puțin rezistent în mediul extern). Nu există o metodă perfectă pentru recoltarea p.p. atunci când

se suspicionează o infecţie cu *B. pertussis* (toate metodele au diferite limite atât din punctul de vedere al sensibilităţii sau specificităţii cât şi din punct de vedere practic).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv Gram. Examinăm frotiurile la microscopul optic cu imersie şi notăm prezenţa **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite) şi prezenţa **cocobacililor gram- negativi,** dispuşi separat sau în perechi, rareori în lanţuri scurte. Datorită faptului că aceste microorganisme se colorează relativ slab în coloraţia Gram ar putea fi necesară colorarea frotiului de rezervă printr-o altă metodă (imunofluorescenţă directă) sau recolorarea prelungită cu fucsină sau safranină.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). *Bordetella pertussis* este un microorganism foarte pretenţios care **nu** se poate dezvolta pe medii de cultură obişnuite; este inhibat de acizi graşi, peroxizi organici etc. Izolarea *B. pertussis* în culturi este dificilă, dar eforturile sunt necesare pentru a putea fi evaluată variaţia genetică (de fază) şi respectiv pentru a putea supraveghea fenomenul apariţiei rezistenţei la antibiotice şi chimioterapice.

Bordetella pertussis necesită pentru cultivare nicotinamidă sau acid nicotinic şi o temperatură optimă de 35-37°C, cu incubare timp de 3-7 zile, în aerobioză şi atmosferă umedă. Cel mai cunoscut mediu de cultură este mediul Bordet-Gengou care conţine agar, macerat de cartof, sânge, glicerol şi devine selectiv prin adăugare de penicilină/meticilină sau cefalexină. Albuminele plasmatice din acest mediu leagă acizii graşi şi permit dezvoltarea microorganismelor. Dezavantajul principal al mediului clasic Bordet-Gengou este reprezentat de timpul scurt în care poate fi utilizat (1-7 zile).

Actualmente se recomandă utilizarea unui mediu folosit iniţial ca mediu de transport, care include geloză nutritivă, cărbune activat şi este suplimentat cu 10% sânge de cal. Acest mediu poate fi utilizat pe parcursul a 1-2 luni, iar coloniile de *B. pertussis* apar mai rapid.

În vederea izolării primare este necesar mediul Bordet-Gengou sau mediul cu cărbune activat, însă prin treceri repetate coloniile se pot dezvolta şi pe geloză-sânge sau chiar şi pe geloză simplă. Microorganismul se va multiplica mai rapid, coloniile vor fi mai opace şi vor apărea modificări morfologice (pleomorfism), alterări structurale, virulenţa fiind scăzută.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt cocobacili gram negativi, mici, cu dimensiunea de 0,2-0,5 µm/0,5-2 µm, imobili, dispuşi separat sau în perechi, rareori în lanţuri scurte, cu tendinţa de a deveni pleomorfi în urma subcultivărilor (pot apărea şi forme filamentoase). Utilizând coloraţii speciale, în coloniile rezultate din primoculturi se pot evidenţia structurile capsulare. Dacă frotiul se colorează cu albastru de toluidină, se pun în evidenţă granule metacromatice situate bipolar. Imunofluorescenţa directă este utilă şi pentru identificarea microorganismului după cultivare.
- Caractere de cultură: Produc colonii de tip S sau M. După 3-7 zile de incubare la 37°C pe mediul Bordet-Gengou se pot dezvolta colonii de tip S mici, convexe, uşor transparente, cu strălucire metalică, foarte aderente, înconjurate de un halou de hemoliză (faza I). În lumina transmisă oblic coloniile seamănă cu picăturile de mercur. Pe medi-

ul cu cărbune activat coloniile apar mai repede, sunt tot de tip S, mici, convexe, negre, cu suprafaţa perlată.

- Caractere biochimice:
  - *Bordetella pertussis* este hemolitică, oxidazo pozitivă, ureazo negativă.
  - Se pot utiliza truse comerciale manuale care identifică specii de bacili gram negativi (ex. API 20 E, API 20 NE), fiind de regulă necesare şi teste adiţionale de identificare.
- Caractere antigenice:
  - Se utilizează seruri cu anticorpi cunoscuţi pentru identificarea tulpinilor de *Bordetella pertussis*, prin reacţia de aglutinare pe lamă.
- Alte teste de identificare utilizate în laboratoare de referinţă: Se poate utiliza amplificarea genetică folosind diferite amorse (primeri); tehnica PCR are o bună specificitate şi sensibilitate dezavantajul principal fiind reprezentat de costul ridicat.

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **poate fi necesară** în scopul supravegherii apariţiei fenomenului de rezistenţă la antibiotice şi se realizează prin metode difuzimetrice.

Diagnosticul serologic este tardiv. Din punct de vedere tehnic au fost utilizate RFC, reacţiile de aglutinare, hemaglutinare şi hemaglutinoinhibare sau tehnicile de tip ELISA. Anticorpii apar din a 2-a sau a 3-a săptămână de boală. Diagnosticul serologic ar putea fi util pentru un diagnosticul diferenţial (retrospectiv) sau din punct de vedere epidemiologic.

BCU "M. EMINESCU" IAŞI
BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

39. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE MICROORGANISME DIN GENUL *BRUCELLA*

Genul *Brucella* cuprinde 7 specii, cu numeroase biotipuri, care infectează animalele şi se pot transmite de cele mai multe ori accidental omului de ex. *Brucella melitensis* (capre, oi), *Brucella abortus* (vaci), *Brucella suis* (porci), *Brucella canis* (câini). Sunt cocobacili gram negativi (de multe ori coloraţi bipolar), cu dimensiuni de 0,5-0,6 µm/ 0,6-1,5 µm, imobili, prezentând eventual o structură capsulară, nesporulaţi, localizaţi în mod caracteristic intracelular, aerobi facultativ anaerobi, catalazo pozitivi, relativ inactivi metabolic, care se dezvoltă relativ dificil pe mediile de cultură intrând în categoria bacteriilor pretenţioase cu necesităţi nutritive complexe, sunt bacterii fastidioase (mai ales atunci când se realizează cultivarea iniţială, din p.p.).

Brucelele sunt microorganisme parazite pentru o serie de animale sau pentru om, capabile să determine infecţii acute, cronice sau infecţii inaparente. Cronicizarea depinde de capacitatea de multiplicare în celule fagocitare. Formele cele mai grave apar ca urmare a infecţiei cu *Brucella melitensis*, urmată de infecţia cu *Brucella suis*, *Brucella abortus* şi respectiv *Brucella canis*.

Transmiterea la om poate fi realizată pe cale digestivă, cutanată şi mai rar pe cale respiratorie. De la nivelul porţii de intrare, microorganismele ajung la nivelul ganglionilor limfatici regionali, depăşesc această barieră şi pe calea ductului toracic ajung în sânge, iar pe cale sangvină în organele cu sistem reticulohistiocitar şi la nivel osos. Incubaţia este în medie de 2-3 săptămâni, însă uneori pot trece câteva luni între momentul infectării şi apariţia fenomenelor clinice. Debutul este de obicei insidios, manifestat prin astenie, indispoziţie, cefalee, artralgii, febră moderată, transpiraţii abundente. În perioada de stare simptomele sunt polimorfe, bruceloza fiind una din bolile extrem de greu de recunoscut clinic. Febra ondulantă (care creşte în cursul după amiezii şi scade în timpul nopţii) însoţită de frisoane are o valoare istorică. În realitate, curba febrilă are un aspect variabil. Transpiraţiile abundente nocturne, cu un miros caracteristic, astenia, durerile sub diverse forme reprezintă alte elemente care pot fi comune în cursul bolii. S-au descris circa 200 de semne clinice care pot apare în bruceloză.

Durata bolii poate fi de 3-4 săptămâni, dar cel mai frecvent depăşeşte 3 luni, ajungând în formele cronice la ani de zile. În formele cronice diagnosticul se stabileşte foarte dificil.

Diagnosticul brucelozei

În principiu, în realizarea diagnosticului se porneşte de la aspecte clinice şi epidemiologice, însă diagnosticul de laborator este esenţial, reprezentând unica metodă certă pentru un diagnostic pozitiv.

Diagnosticul de laborator în bruceloză poate fi bacteriologic (direct) sau serologic. Diagnosticul bacteriologic include următoarele etape.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special cât mai rapid după debutul bolii şi înainte de iniţierea antibioterapiei. Produsul patologic este reprezentat cel mai frecvent de **sânge**, dar

s-ar putea recolta şi prin puncţie ganglionară, puncţie medulară (rata de izolare creşte), puncţie hepatică sau splenică, sau ar putea fi reprezentat de LCR, urină, bilă, lapte, materiale necroptice etc în funcţie de simptomatologie şi stadiul bolii. În continuare vom discuta situaţia în care se realizează o **hemocultură** prin metode clasice sau în sisteme de cultivare rapide, de tipul BacTAlert, Bactec sau Septi-Chek (vezi şi capitolul 31).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic nu aduce de regulă informaţii utile diagnosticului, în special dacă este vorba de sânge. Se poate folosi tehnica imunofluorescentă care uneori duce la rezultate pozitive.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Toate speciile au cerinţe nutritive complexe necesitând pentru dezvoltare medii îmbogăţite cu substanţe nutritive (aminoacizi, proteine serice, glucoză, săruri, vitamine, ser, sânge etc). Se recomandă efectuarea hemoculturilor în mediul bifazic (solid-lichid), ex. tip Castaneda. Cultura se incubează în atmosferă de 5-10% CO_2, la 37°C pentru o perioadă de minim 2-3 zile; culturile negative trebuie urmărite până la 4 săptămâni. În cazul mediului bifazic, vom însămânţa panta de mediu solid la fiecare 2-3 zile, fără a deschide flaconul.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt cocobacili gram-negativi cu cu dimensiuni de 0,5-0,6 µm/0,6-1,5 µm, dispuşi izolat sau în perechi, lanţuri scurte, grupat. Se pot colora bipolar. Poate fi necesară o prelungire a timpului de recolorare cu fucsină, altfel sunt palid coloraţi.
- Caractere de cultură:
  - Pe mediile îmbogăţite corespunzătoare nutritiv, pot produce după 2-3 zile colonii de tip S, cu un diametru de circa 1 mm; dimensiunea coloniilor se măreşte astfel încât la 1 săptămână de incubare diametrul poate fi de 6-7 mm; pot fi identificate (în special după incubare prelungită) colonii de tip R sau M
  - Examinate folosind o sursă de lumină la 45°, coloniile apar transparente, galben-deschis, asemănător „picăturilor de miere" în timp ce în lumina reflectată prezintă o transparenţă cenuşiu-albăstruie
- Caractere biochimice:
  - *Brucella spp.* după repicare pe un mediu neselectiv prezintă un metabolism oxidativ
  - Microorganismele sunt catalazo pozitive, în timp ce testarea reacţiilor oxidazei, ureazei şi producerii de H_2S pot da rezultate variabile; se pot utiliza sisteme clasice de testare, dar este posibilă şi utilizarea galeriilor API (ex. API 20E)
  - Testăm necesitatea în CO_2, pentru izolare
  - Se mai pot verifica metabolizarea glucozei, lactozei precum şi sensibilitatea la diferiţi coloranţi incluşi de ex. în medii de cultură (ex. tionină sau fucsină bazică)
- Caractere antigenice:
  - Utilizăm seruri imune anti-*Brucella* adsorbite, prin reacţii de aglutinare pe lamă (există reacţii încrucişate); în cazul unei reacţii pozitive, la nivelul laboratoarelor de

B.C.U. "M. EMINESCU" IASI

referinţă se pot realiza reacţii de aglutinare pe lamă cu seruri imune monospecifice (anti-A, M sau anti-R în cazul coloniilor de tip R)

- Testarea sensibilităţii la bacteriofagi (lizotipia) se poate utiliza în studii epidemiologice sau în scop de cercetare, fiind rezervată laboratoarelor de referinţă; spre exemplu fagul Tbilisi lizează tulpinile de *B. abortus*, poate liza la concentraţii crescute tulpinile de *B. suis*, dar nu lizează tulpinile de *B. melitensis*, *B. canis* sau tulpinile în formă R

- Alte teste utilizate în identificare la nivelul centrelor de referinţă:
  - tehnici ale biologiei moleculare (există sonde nucleotidice specifice pentru diferite biotipuri izolate mai frecvent, de ex. 1 şi 3 aparţinând *B. melitensis;* se încearcă punerea la punct a PCR, pentru diagnosticul brucelozei).

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice) se realizează prin metoda difuzimetrică standardizată, şi este utilă atât în scopul supravegherii apariţiei unor tulpini rezistente la medicamentele antimicrobiene cât şi pentru stabilirea tratamentului corespunzător în cazul unei maladii infecţioase în general dificil de tratat.

Diagnosticul serologic

Este de multe ori necesar, ţinând cont de dificultăţile întâlnite în cursul diagnosticului bacteriologic. Utilizăm antigene cunoscute şi încercăm să determinăm prezenţa anticorpilor specifici în sângele pacientului, valoarea titrului anticorpilor şi respectiv evoluţia acestui titru în dinamică. Trebuie să menţionăm că anticorpii de tip IgM cresc în infecţia acută (în câteva săptămâni) dar persistă şi în infecţia cronică sau chiar şi după tratamentul antibiotic realizat corespunzător (timp de 1-2 ani). Anticorpii de tip IgG apar după circa 3 săptămâni de la debutul brucelozei, ating o valoare maximă la 6-8 săptămâni şi persistă în cazul unei infecţii cronice.

În special din punct de vedere istoric discutăm şi putem practica în cadrul lucrărilor practice, aglutinarea pe lamă (Huddleson, reacţie calitativă, de screening). Cea mai cunoscută şi utilizată tehnică de diagnostic serologic este reacţia de aglutinare în tuburi (Wright) prin care putem determina atât titrul anticorpilor de tip IgM cât şi cel al anticorpilor de tip IgG.

Având în vedere faptul că în bruceloză apar şi anticorpi blocanţi (Ac de tip IgA care blochează activitatea aglutinantă a Ac IgM sau IgG), care pot persista ani de zile, există dificultăţi şi în ceea ce priveşte interpretarea rezultatelor obţinute în diagnosticul serologic.

Pentru a simplifica, considerăm că un titru $\geq$ 1/160 este sugestiv, în timp ce o creştere de 4 ori în dinamică a titrului, poate confirma diagnosticul de bruceloză.

Există o serie de variante tehnice care permit reducerea erorilor de interpretare:

- diluarea suplimentară a serurilor de cercetat
- testul de blocare (adăugăm tuburilor în care reacţia Wright este negativă câte 1 picătură de ser imun anti-*Brucella;* dacă reacţia rămâne negativă şi nici în acest caz nu apare aglutinarea, concluzionăm că în serul de cercetat există anticorpi blocanţi)
- testul Coombs
- utilizarea unei tehnici de tip ELISA pentru detectarea Ac de tip IgM şi IgG care apar faţă de proteinele membranei externe etc.

Diagnosticul imunobiologic

Datorită faptului că în infecţia cu *Brucella spp.* este stimulat în special răspunsul imun mediat celular, diferiţi autori menţionează utilizarea intradermoreacţiei cu brucelină în investigarea unui caz suspect de bruceloză. IDR cu brucelină poate identifica existenţa unei stări de hipersensibilitate de tip IV, faţă de antigenul brucelos.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

40. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Genul *Corynebacterium* include mai multe specii de bacili gram-pozitivi (se pot colora neuniform), uşor incurbaţi, măciucaţi, aşezaţi în V, L, în mici grămezi neregulate sau în palisade, nesporulaţi, necapsulaţi, imobili, aerobi şi facultativ anaerobi, catalază pozitivi.

Studii recente au delimitat grupul *Corynebacterium diphtheriae* în care se regăsesc speciile *C. diphtheriae, C. pseudotuberculosis* şi *C. ulcerans* (ultimele două fiind uree pozitive). Cultivă mai bine pe medii îmbogăţite (de ex. cu adaos de ser sau sânge). Au capacitatea (în cazul conversiei genetice) de a elabora exotoxină. *C. diphtheriae* include patru biotipuri: gravis, mitis, intermedius şi belfanti.

După pătrunderea care are loc cel mai frecvent la nivelul tractului respirator (faringian, nazal), urmează multiplicarea şi inducerea unei inflamaţii locale. Tulpinile lizogene (infectate cu bacteriofagi tox+) sintetizează toxina care poate afecta orice tip de celulă, dar cele mai importante efecte sunt la nivel cardiac (miocardită), nervos (demielinizare), renal (necroză tubulară), suprarenalian, muscular şi hepatic. În câteva zile de la debutul infecţiei, toxina induce apariţia unei „structuri" compuse din fibrină, leucocite, eritrocite, celule epiteliale respiratorii moarte şi bacterii, respectiv **falsa membrană** de culoare gri-maronie *(diphthera* - membrană). Această structură se poate forma local (amigdalian, faringian, nazal etc) sau se poate extinde, acoperind faringele, obstrucţionând arborele traheobronşic (crup laringian, asfixie mecanică). La adăpostul falsei membrane, bacilii îşi continuă multiplicarea şi sinteza de toxină care difuzează pe cale sanguină şi conduce la apariţia unor tulburări la distanţă (tulburări de ritm cardiac, miocardită, dificultăţi vizuale, de vorbire, de înghiţire etc).

Cu cât diagnosticul este mai tardiv, cu atât rata mortalităţii prin difterie creşte.

Datorită faptului că în ultimii 15 ani nu au mai fost înregistrate cazuri de boală în ţara noastră, există riscul nerecunoaşterii acestei patologii de către medicii care nu au văzut niciodată un caz de difterie. Riscul apariţiei cazurilor există iar sistemul de sănătate trebuie să fie în permanenţă pregătit pentru a reacţiona prompt, din toate punctele de vedere (clinic, terapeutic, diagnostic, epidemiologic etc).

Diagnosticul de laborator în difterie este bacteriologic, direct şi trebuie realizat urgent; există anumite particularităţi care trebuie menţionate.

În cazul suspicionării unui caz de difterie diagnosticul şi instituirea tratamentului se impun cu maximă **urgenţă**. Se porneşte de la un diagnostic prezumtiv bazat pe următoarele semne: a). amigdalită şi/sau faringită cu dureri de intensitate medie plus asocierea unei „false membrane"; b). adenopatie şi edem cervical, mai ales dacă se asociază cu faringită membranoasă şi semne de toxicitate sistemică; c). cornaj şi stridor (respiraţii zgomotoase şi şuierătoare), tiraj (depresiunea părţilor moi suprasternale, supraclaviculare, intercostale, epigastrice în momentul efortului respirator); d). paralizia palatului moale; e). secreţie nazală serosanguinolentă asociată cu prezenţa unor „false membrane" la nivelul mucoasei.

Se adaugă din punct de vedere bacteriologic examinarea frotiurilor realizate din produsul patologic colorate Gram şi cu albastru de metilen. Tratamentul specific (administrare de antitoxină) se instituie fără întârziere, fără a aştepta finalizarea diagnosticului bacteriologic.

Diagnosticul direct (bacteriologic), cu realizarea etapelor corespunzătoare, este util pentru confirmare şi în scop epidemiologic.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6). Produsul patologic este reprezentat cel mai frecvent de **secreţii de la nivelul faringelui** şi **de secreţii nazale.** În cazul prezenţei „falsei membrane" se recomandă detaşarea cu precauţie a acesteia şi recoltarea secreţiei aflate sub această structură. În vederea prelevării p.p. vom utiliza minim patru tampoane diferite, trei pentru recoltarea secreţiilor faringiene şi al patrulea pentru recoltarea secreţiilor nazale. Primul tampon va fi utilizat pentru realizarea frotiurilor, al doilea se va utiliza pentru cultivare pe diferite medii de cultură solide, selective şi neselective (ex. geloză sânge, Loeffler şi medii cu telurit de potasiu, precum mediul Tinsdale), în timp ce al treilea şi al patrulea tampon vor fi introduse într-un mediu de îmbogăţire (OST, ouser-telurit). Pentru fiecare cultivare în parte există un anumit algoritm. Spre exemplu, mediul Loeffler va fi incubat pentru 4-8 ore la 35-37°C după care se va realiza un prim frotiu, colorat Gram. Dacă rezultatul este negativ tubul se reincubează timp de 18 ore iar dacă este pozitiv se face o repicare pe mediul Tinsdale şi se începe identificarea pe baza caracterelor biochimice.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic poate fi **decisivă** (în context clinic şi/sau epidemiologic sugestiv) pentru începerea tratamentului specific. Realizăm minim două frotiuri, unul colorat Gram iar celălalt colorat cu albastru de metilen. Prezenţa unor semne clinice sugestive la care se adaugă vizualizarea pe frotiul colorat Gram a leucocitelor şi a unor bacili gram-pozitivi (la limită), uşor incurbaţi, măciucaţi, aşezaţi în V, L sau „sub formă de litere chinezeşti" în timp ce la coloraţia cu albastru de metilen (modificată) am putea remarca prezenţa granulelor metacromatice poate conduce la administrarea de antitoxină difterică; diagnosticul de certitudine urmează a fi stabilit ulterior.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Aspectul cel mai caracteristic se înregistrează pe mediile cu telurit de potasiu (ex. Gundel-Tietz, Hoyle etc), după 24-48 de ore. Biotipul gravis formează colonii opace de tip R, plate, cu margini crenelate, cu tendinţa de a se desface în fragmente atunci când sunt prelevate cu ansa, relativ dificil de emulsionat, de culoare cenuşie sau neagră, diametrul coloniei fiind de 1,5-2 mm. Biotipul *intermedius* formează colonii opace de tip S, plate cu centrul mamelonat, de culoare cenuşie sau neagră cu margine transparentă, diametrul coloniei fiind de 1,5-2 mm (dar se recunoaşte prezenţa unor colonii de dimensiuni diferite). Biotipul *mitis* formează colonii de tip S care pot trece în forma R prin „îmbătrânire", cu suprafaţă lucioasă, culoare cenuşie sau neagră, translucide, diametrul coloniei fiind de 0,5-1 mm. Biotipul *belfanti* formează colonii opace de tip S, de culoare cenuşie sau neagră, diametrul coloniei fiind de 1,5-2 mm (dar se recunoaşte prezenţa unor colonii de dimensiuni diferite).

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Se examinează cel mai bine atunci când frotiul este realizat din colonii apărute pe mediul Loeffler (aspecte „tipice" apar şi în cazul frotiurilor din p.p.). Sunt bacili gram-pozitivi (la limită), polimorfi, cu dimensiuni de 1-8 μm/

0,5-0,8 μm, uşor incurbaţi, măciucaţi, aşezaţi în V, L sau „sub formă de litere chineze şti". Există recomandarea realizarea unor frotiuri „colorate" imunofluorescent, ceea ce ar permite realizarea unui diagnostic mai rapid.

- Caractere de cultură:
  - În funcţie de biotip, produc colonii de tip S sau R, aşa cum am menţionat mai sus. Pe mediile de tipul gelozei-sânge aspectul morfologic este aproape similar, culoarea fiind albă sau gri perlat. Biotipurile intermedius, mitis şi belfanti produc o zonă mică de β-hemoliză.
  - Pe mediul Tinsdale coloniile sunt negre (datorită producerii de H_2S) cu halo grimaro. Anumiţi autori menţionează că frotiurile realizate pornind de la coloniile dezvoltate pe acest mediu permit evidenţierea granulelor metacromatice.
  - Pe mediul Loeffler (mediu electiv) coloniile apar în 18 ore fiind albe, lucioase, bombate, semicremoase, asemănătoare picăturilor de spermanţet.
- Caractere biochimice:
  - În scopul diferenţierii *C. diphtheriae* de alte specii ale genului se practică testul pirazinamidazei (negativ) şi cistinazei (pozitiv). Testul catalazei este pozitiv.
  - Diferenţierea biotipurilor şi confirmarea diagnosticului de specie se realizează prin testul catalazei (pozitiv), ureazei (negativ), reducerea nitraţilor şi fermentarea unor zaharuri.
  - Se pot utiliza sisteme comerciale, precum galeriile API CORYNE care se bazează pe combinarea testelor biochimice cu testele enzimatice (20 teste)
- Caractere antigenice:
  - Se utilizează ser antitoxină diftrică pentru identificarea producerii toxinei prin testul ELEK (vezi şi capitolul 16). Testul poate fi interpretat la 24-48 ore; este un test simplu şi precis.
- Caractere de patogenitate:
  - Testarea toxigenezei in vivo, pe cobai, la nivelul centrului de referinţă; cultura este inoculată subcutanat la un lot de cobai neprotejaţi şi un lot de cobai protejaţi (cu antitoxină diftrică). În cazul în care cultura testată include microorganisme toxigene, cobaii neprotejaţi mor în 24-48 ore cu evidenţierea semnelor de intoxicaţie diftrică.
  - Testarea producerii de toxină pe celule Vero sau prin alte metode (Western-blot, ELISA, PCR pentru subunităţi ale genei **tox+** etc)
  - Testarea sensibilităţii la bacteriofagi (lizotipia) se poate utiliza în studii epidemiologice sau în scop de cercetare, fiind rezervată laboratoarelor de referinţă.
- Alte caractere/teste utilizate în identificare la nivelul centrelor de referinţă:
  - teste biochimice suplimentare
  - tehnici ale biologiei moleculare (ribotipie, profilul de restricţie al unei regiuni caracteristice, după amplificare genică etc).

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice) se poate realiza prin metoda difuzimetrică standardizată, în special în scopul supravegherii apariţiei unor tulpini rezistente la medicamentele antimicrobiene. De regulă, tulpinile de *C. diphtheriae* sunt sensibile la antibioticele folosite uzual în tratament (penicilină, eritromicină).

41 DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *LISTERIA*

Genul cuprinde mai multe specii dintre care cea mai importantă specie este *Listeria monocytogenes*, care poate produce infecţii variate, umane şi animale. Mai rar au fost izolate tulpini din speciile *L. ivanovii* şi sau *L. seeligeri*. Sunt bacili fini gram pozitivi, aerobi facultativ anaerobi, mobili la 25°C, care se dezvoltă preferenţial la 30°C dar se poate multiplica şi la temperatura frigiderului („îmbogăţire la rece").

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes este patogenă prin multiplicare şi invazivitate (prezintă o structură asemănătoare proteinei M streptococice, produce diferite substanţe cu rol în invazivitate, inclusiv lecitinaza, fosfolipaza C şi listeriolizina O, cu efect hemolitic). Infectează probabil iniţial celulele intestinale, supravieţuieşte intracelular şi se multiplică intramacrofagic.

Listerioza este o zoonoză. Infecţia umană apare accidental şi foarte frecvent evoluează inaparent. Dintre manifestările clinice grave amintim listerioza perinatală, probabil o infecţie intrauterină (avort spontan, naştere prematură, sepsis cu deces înainte sau relativ repede după momentul naşterii etc). La adulţi pot apărea meningoencefalită, bacteriemie urmată de metastaze septice (mai ales la imunodeprimaţi) şi mai rar, diferite infecţii focalizate.

Dintre toate tipurile antigenice, 90% dintre tulpinile izolate la om aparţin tipurilor Ia, Ib şi IVb. Putem menţiona că tipul IVb a fost mai frecvent asociat cu consumul de brânză făcută din lapte nepasteurizat. Asocierea unor epidemii de listerioză cu consumul de alimente contaminate sugerează calea gastrointestinală drept cea mai importantă cale de pătrundere.

Diagnosticul de laborator microbiologic în infecţiile cu *Listeria monocytogenes* este bacteriologic, direct.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie etc). Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea şi identificarea microorganismului, în special din sânge şi/sau din LCR. În infecţiile produse de *Listeria monocytogenes* se mai pot recolta lichid amniotic, placentă, ţesut fetal, dar şi prelevate patologice contaminate cu alţi germeni precum materii fecale, secreţii genitale, alimente, probe din mediul extern etc.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albas-

tru de metilen (AM) şi respectiv Gram. *Listeria monocytogenes* se prezintă ca bacili sau cocobacili gram pozitivi, cu dimensiuni de 0,5-5 μm/0,5-0,8 μm, dispuşi izolat, în perechi sau în lanţuri scurte, intra sau extracelular.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine colonii izolate şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). De menţionat că se poate multiplica la temperaturi ce variază între 2-45°C (temperatura optimă fiind de 20-30°C); în culturile iniţiale, temperatura scăzută favorizează multiplicarea *L. monocytogenes* („îmbogăţire la rece"); tolerează o atmosferă de 5-10% CO_2 precum şi concentraţii de peste 5% NaCl.

În cazul p.p. necontaminate (sânge, LCR etc) vom utiliza spre ex. agar glucozat sau triptozat, suplimentat cu 5% sânge de berbec. Atunci când dorim să realizăm izolarea pornind de la p.p. contaminate (alimente, materii fecale etc) este necesar să folosim medii de cultură selective spre exemplu însămânţăm iniţial o parte p.p. în 9 părţi de bulion peptonă-triptonă cu extract de carne şi drojdie, suplimentat cu cu acid nalidixic şi acriflavină iar după 2-7 (sau chiar 30) zile de incubare la temperatura frigiderului, incubăm încă 18-24 de ore la 35-37°C. Ulterior realizăm o repicare pe medii selective (ex. agar, acriflavină, polimixină B, clorură de litiu, ceftazidimă etc). Există şi alte strategii folosite pentru izolarea *L. monocytogenes*.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili fini sau cocobacili gram pozitivi, cu dimensiuni de 0,5-5 μm/0,5-0,8 μm, dispuşi separat sau grupaţi în palisade, în perechi sau „în formă de litere" (asemănător corynebacteriilor). În culturile tinere predomină formele cocobacilare în timp ce în culturile vechi se caracterizează prin pleomorfism şi pot apărea forme filamentoase. În preparatul proaspăt se poate demonstra mobilitatea, în special dacă s-a menţinut cultura la 18-25°C (sau la temperatura camerei).
- Caractere de cultură: Cultura degajă un miros de lapte acidulat. *L. monocytogenes* formează colonii de tip S. După 1-2 zile de incubare la 35-37°C pe agar glucozat, coloniile ating un diametru de 1-1,5 mm (mai mici pe agarul triptozat); pot să aibă aspect de picături de rouă. Pe agar-sânge, coloniile sunt înconjurate de o zonă discretă de β-hemoliză. Dacă însămânţăm prin înţepare o coloană de mediu semisolid, datorită mobilităţii va apărea creşterea „în umbrelă", caracteristică pentru *L. monocytogenes*. Multiplicarea la temperaturi extreme (2-45°C) poate fi utilă pentru identificare.
- Caractere biochimice:
  - *L. monocytogenes* produce o zonă discretă de β-hemoliză.
  - Utilizarea unor tulpini standard de *Staphylococcus aureus* (pentru *L. monocytogenes* şi *L. seeligeri)* sau de *Rhodococcus equi* (pentru *L. ivanovii)* în cadrul testului CAMP este utilă pentru identificare.
  - *L. monocytogenes* este catalazo-pozitivă şi fermentează o serie de carbohidraţi (fără producere de gaz).
  - Se pot utiliza truse comerciale manuale (ex. API Listeria sau API 20 Strep) şi respectiv truse automate (ex. rapid ID 32 Strep) care permit identificarea *L. monocytogenes* în 4-24 de ore, în funcţie de trusa utilizată.

- Caractere antigenice:
  - Se utilizează seruri cu anticorpi cunoscuţi pentru identificarea tulpinilor de *Listeria monocytogenes*, prin tehnici imunologice, în funcţie de Ag somatice sau flagelare. Serotiparea este utilă în scop epidemiologic. Există 13 serotipuri (serovaruri) majoritatea tulpinilor izolate la om aparţinând tipurilor Ia, Ib şi IVb.
- Sensibilitatea la bacteriofagi: Lizotiparea este foarte utilă în scop epidemiologic; există tulpini care nu pot fi testate prin această metodă.
- Caractere de patogenitate: În general, tulpinile de *Listeria monocytogenes* izolate de la pacienţi sunt virulente. În laboratoare de referinţă pot fi efectuate însă şi teste de patogenitate. Dintre acestea o variantă este reprezentată de cultivarea în bulion timp de 24 de ore, urmată de inocularea unei picături de cultură în sacul conjunctival la iepure sau cobai; tulpina virulentă va determina apariţia unei conjunctivite purulente în 1-3 zile. Alte modalităţi de studiere a virulenţei tulpinilor izolate sunt reprezentate de inoculări la şoareci imunocompromişi (inoculare intraperitoneală) sau de inocularea membranei chorioalantoidiană a oului embrionat de găină.
- Alte teste rezervate centrelor de referinţă: În scop epidemiologic sau în cadrul unor studii taxonomice se pot utiliza Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), analiza macrorestricţiei ADN, RFLP sau RAPD-PCR.

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **poate fi necesară** şi se realizează de obicei prin metode difuzimetrice. În cazul infecţiilor grave se vor determina CMI şi CMB (vezi capitolul 14).

BCU IAŞI CENTRAL LIBRARY

42 DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *MYCOBACTERIUM*

Elementele minime necesare stabilirii apartenenţei la genul *Mycobacterium* sunt reprezentate de: 1. rezistenţa la decolorarea cu acid-alcool (bacili acid-alcool rezistenţi, BAAR); 2. prezenţa unor acizi mycolici care conţin 60-90 atomi de carbon şi care pot fi clivaţi prin piroliză în acizi graşi cu 22 şi respectiv 26 atomi de carbon; 3. un conţinut procentual de G+C de 61-71%.

În afară de *M. tuberculosis* şi *M. leprae,* au fost descoperite o serie de alte mycobacterii considerate anterior saprofite dar care fiind condiţionat patogene, sunt relativ frecvent implicate în patologia gazdelor imunocompromise (mycobacterii ne-tuberculoase, „atipice" etc). Genul *Mycobacterium* include peste 80 de specii diferite, multe dintre acestea fiind larg răspândite în natură. În continuare vom discuta aspectele legate de diagnosticul de laborator (microbiologic) în infecţiile produse de *M. tuberculosis,* varianta *hominis.*

Tuberculoza poate avea localizări variate, dar cea mai frecvent întâlnită este tuberculoza pulmonară. Din punct de vedere epidemiologic, pacienţii cu tuberculoză pulmonară (care elimină prin spută BAAR) reprezintă sursa de infecţie cea mai importantă. Diagnosticul, tratamentul corect şi complet al acestor pacienţi este **esenţial.**

Diagnosticul poate fi sugerat de elemente clinice, paraclinice (ex. radiologice), alte elemente de laborator, dar trebuie confirmat prin izolarea şi identificarea *M. tuberculosis.*

Diagnosticul de laborator microbiologic este în mod esenţial bacteriologic (direct), la care se pot adăuga datele obţinute în cadrul diagnosticului imunobiologic şi serologic.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientului să fi primit antibiotice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie inclusiv **protecţia personalului medical implicat** etc). În funcţie de forma clinică de tuberculoză se pot recolta următoarele produse patologice: spută, lichid de spălătură bronşică, LCR, urină, lichide recoltate prin puncţie articulară, peritoneală, pleurală, pericardică, probe obţinute prin biopsie, puroi etc. Uneori este necesară concentrarea p.p. prin centrifugare. În continuare vom discuta cazul în care p.p. este reprezentat de **spută** (vezi şi capitolul 6). Sputa trebuie decontaminată (de ex. prin tratare cu NaOH 4%) şi neutralizată în vederea baciloscopiei şi cultivării.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea a minim trei frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu AM, Gram şi respectiv Ziehl Neelsen. Frotiurile se examinează la microscopul optic cu imersie şi se notează prezenţa **celulelor** de la nivelul tractului respirator (ex. macrofage alveolare), prezenţa **celulelor inflamatorii** (ex. leucocite) şi prezenţa **BAAR.** În ţesuturile animalelor bolnave bacilii tuberculoşi apar ca bastonaşe subţiri, rectilinii, cu dimensiunea

de 0,4μm/3 μm, acid-alcool rezistenţi (apar roşii pe fond albastru, toate celulele şi bacteriile non-AAR sunt colorate în albastru, la coloraţia Ziehl-Neelsen), imobili, necapsulaţi, nesporulaţi. Se poate utiliza şi coloraţia fluorescentă. Examenul microscopic rămâne o etapă esenţială în diagnosticul unei infecţii mycobacteriene atât în momentul examinării unui produs patologic (examenul microscopic direct) cât şi în momentul când prin microscopie se confirmă (sau infirmă) morfologia şi tinctorialitatea microorganismelor dintr-o colonie izolată.

Rezultatele examenului microscopic (coloraţie fluorescentă şi Ziehl-Neelsen) trebuie cuantificate prin numărul de BAAR în raport cu numărul de câmpuri examinate (10-30 în cazul coloraţiei fluorescente, 100-300 în cazul coloraţiei Z-N). Spre exemplu, prezenţa a 1-9 bacili/10 câmpuri în microscopia cu fluorescenţă şi respectiv a 1-9 BAAR/100 de câmpuri în microscopia optică permite notificarea în buletinul de analiză a unui rezultat cu 1+ în timp ce prezenţa a 10-90 bacili/1 câmp în microscopia cu fluorescenţă şi respectiv a 1-9 BAAR/1 câmp în microscopia optică permite notificarea în buletinul de analiză a unui rezultat cu 3+ (maxim fiind 4+, atunci când se identifică spre ex. peste 9 BAAR/1 câmp la coloraţia Z-N). Notaţia semicantitativă este obligatorie deoarece exprimă unitar densitatea BAAR pe frotiu indiferent de metoda folosită, permiţând comparaţii între laboratoare diferite, între bolnavi diferiţi şi pentru acelaşi bolnav în momente evolutive diferite. Dacă rezultatul final este „nedeterminat" trebuie să facem încă un frotiu din acelaşi produs patologic şi să indicăm recoltarea unui nou produs patologic. Baciloscopia negativă **nu exclude** diagnosticul de tuberculoză.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine o cultură pură, care se va identifica. În momentul actual, la nivel mondial, există o mare varietate de medii de cultură. Mycobacteriile se dezvoltă în general pe medii complexe. Mediile de cultură utilizate în diagnosticarea unei infecţii mycobacteriene se împart în 3 grupe principale: medii de cultură lichide (ex. bulion 7H9), medii de cultură pe bază de ou (ex. mediul **Löwenstein**) şi medii de cultură bazate pe compoziţia în agar (tip Middlebrook). Pentru izolarea primară a mycobacteriilor se pot folosi medii foarte variate, din fiecare grup menţionat. Mediile pe bază de ouă au ca ingrediente: ouă sau gălbenuş de ouă, făină de cartof, săruri, asparagină şi glicerol. Mediul este solidificat prin coagulare. Aceste substanţe reprezintă elementele de bază ale mediului clasic Löwenstein-Jensen la care se adaugă verde malachit pentru selectivitate (în acelaşi scop se pot adăuga antibiotice). Dezvoltarea *M. bovis, M. africanum* precum şi a tulpinilor de *M. tuberculosis* rezistente la HIN este favorizată de suplimentarea cu 0,4% piruvat de sodiu a mediului Löwenstein-Jensen.

Atunci când încercăm să realizăm izolarea primară, este necesar ca mediile de cultură să se incubeze într-o atmosferă de 8-10% CO_2. Culturile se incubează de rutină la o temperatură de 35-37°C. Mediile de cultură solide se vor examina zilnic în prima săptămână după inoculare iar apoi săptămânal până la împlinirea a 6-8-12 săptămâni deoarece mycobacteriile tuberculoase au o rată de diviziune de 12-27 ore.

Se pot utiliza şi sisteme de cultivare „rapidă" (ex. MB-Bact, Bactec) cu depistarea creşterii mycobacteriene în 4-25 de zile. În România aceste sisteme au început să fie utilizate în unele centre începând cu anul 1998. Aceste sisteme permit testarea sensibilităţii la medicamentele anti-mycobacteriene pentru tulpinile izolate, conform recomandărilor programului naţional.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: În frotiul realizat din colonia izolată se evidenţiază BAAR
- Caractere de cultură: *M. tuberculosis* şi respectiv *M. bovis*-BCG formează colonii R, rugoase, neregulate, conopidiforme, grunjoase, greu de emulsionat, nepigmentate. Tulpinile de *M. tuberculosis* rezistente la HIN pot forma colonii de tip S.
- Caractere biochimice: Identificarea speciei se realizează pe baza a câteva teste fenotipice clasice şi anume: testul producerii de niacină, testul reducerii nitraţilor, testul catalazei la 22°C şi la 68°C, hidroliza tween 80, susceptibilitatea la hidrazida acidului 2-tiofen-carboxilic (TCH) şi susceptibilitatea la acidul p-amino salicilic (PAS). Primele 3 teste dau rezultate pozitive pentru *M. tuberculosis* (în timp ce pentru M. bovis numai al 3-lea test este pozitiv). Testul catalazei la 68°C şi respectiv hidroliza Tween 80 sunt negative pentru ambele specii (hidroliza Tween 80 poate fi pozitivă pentru *M. tuberculosis*). *M. tuberculosis* se dezvoltă pe mediul cu TCH în timp ce *M. bovis* (sau *M. bovis*-BCG este inhibat de către această substanţă). Testul este util în special în cazul tulpinilor de *M. bovis* care prezintă reacţii pozitive (sau slab pozitive) la primele 2 teste.
- Caractere antigenice: Se pot examina în centre de referinţă.
- Caractere de patogenitate: *M. tuberculosis* este patogen pentru cobai. Inocularea p.p. la cobai este uneori practicată în vederea diagnosticului.
- Alte caractere/teste utilizate în identificare: Se pot utiliza (la nivelul unor centre de referinţă) teste care se bazează pe proprietăţi fenotipice moleculare (ex. studiul cromatografic al acizilor graşi din peretele celular) sau genotipice (fragmente de restricţie ale materialului genetic, sonde nucelotidice, PCR). Există şi posibilitatea testării sensibilităţii faţă de anumiţi mycobacteriofagi etc.

5. Antibiograma (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) **poate fi necesară** şi se realizează conform recomandărilor Programului Naţional de control al tuberculozei. Se pot utiliza metoda concentraţiilor absolute, metoda proporţiilor, metoda rapoartelor de rezistenţă, metode radiometrice etc.

Diagnosticul imunobiologic are la bază un mecanism de răspuns imun de tip celular. Se utilizează intradermoreacţia cu tuberculină (PPD, derivat proteic purificat), vezi capitolul 21.

Diagnosticul serologic se bazează pe răspunsul imun de tip umoral (anticorpii antimycobacterieni pot fi evidenţiaţi prin diferite tehnici, de ex. ELISA). Cu toate că metodologia nu este perfect standardizată, subliniem faptul că în diagnosticul tuberculozei nici un element nu poate fi considerat ca fiind lipsit de importanţă într-un anumit context clinic, paraclinic şi epidemiologic.

*
* *

Deşi nu am prezentat elementele necesare identificării mycobacteriilor netuberculoase dorim să menţionăm că, în cazul utilizării unui număr redus de teste, există riscul de a pune un diagnostic eronat şi respectiv de a considera o tulpină drept *Mycobacterium tuberculosis*, cu toate că a fost izolată o mycobacterie „atipică".

43 DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE *BACILLUS ANTHRACIS*

Genul *Bacillus* aparține familiei Bacillaceae și cuprinde un număr foarte mare de specii, dintre care în patologie sunt mai frecvent implicate *B. anthracis*, *B. cereus* și *B. subtilis*. Germenii din specia *B. anthracis* se prezintă sub formă de bacili gram pozitivi, de dimensiuni mari, imobili, sporulați, cu sau fără capsulă. Sunt aerobi facultativ anaerobi.

Manifestările clinice ale infecțiilor determinate de bacilul antraxului sunt reprezentate de antraxul cutanat (forma cel mai frecvent întâlnită la om), antraxul pulmonar și respectiv antraxul gastrointestinal; în toate formele poate avea loc diseminarea infecției. De menționat că *B. anthracis* infectează în special animalele și poate produce ocazional infecții umane. În ultima perioadă se discută frecvent despre implicarea acestui microorganism în bioterorism.

Diagnosticul de laborator în antrax este bacteriologic, direct și trebuie realizat cât mai rapid; sunt urmate etapele cunoscute dar există anumite particularități.

Diagnosticul unui caz de antrax pornește de la datele clinice și epidemiologice. Examenul bacteriologic va confirma diagnosticul.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii și înainte de inițierea antibioterapiei. Produsul patologic este reprezentat cel mai frecvent de secreții de la nivelul leziunilor cutanate dar se pot recolta și aspirat din edemul local și/sau din ganglionii regionali, spută, materii fecale, alimente incriminate, lichid cefalorahidian, probe necroptice, sânge (pentru hemoculturi) etc, în funcție de forma clinică. În cazul în care este de presupus că p.p. este contaminat se pot folosi o serie de metode, spre ex. utilizarea mediilor selective, tratarea termică sau tratarea cu alcool a p.p. În cazul mediilor selective, agentul selectiv mai frecvent utilizat este polimixina B. În cazul celei de a treia variante, utilizăm etanol steril de 95°. Vom suspensiona p.p. în proporție egală în etanol pentru o durată de 30-60 minute, la temperatura camerei, după care vom preleva circa 0,25 ml din suspensie pe care o cultivăm pe mediul de cultură ales. În cazul în care estimăm că transportul către laborator va dura mai mult de 60 minute, asigurăm o temperatură de transport de 2-8°C. Trebuie să menționăm faptul că atunci când presupunem diagnosticul de antrax, trebuie luate **măsuri** de biosecuritate speciale.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea unor frotiuri care se colorează cu albastru de metilen și Gram; cel puțin un frotiu se va păstra de rezervă. Se mai pot utiliza albastru de metilen policrom (McFadyean) sau coloratia imunofluorescentă, pentru evidențierea capsulei bacteriene. În p.p. se pot remarca structuri tisulare, leucocite și bacili gram pozitivi, cu capetele „tăiate drept", de dimensiuni mari (1-1,5 μm /3-10 μm), capsulați, dispuși izolat, în perechi sau lanțuri scurte, incluși într-o capsulă comună. În coloratia cu albastru de metilen policrom bacilii apar albaștri iar capsula apare ca un halo de culoare roz.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Putem utiliza geloză nutritivă sau geloză sânge, în condiţii de aerobioză, la o temperatură de 37°C (deţi se poate multiplica între 15 şi 42°C). În cazul în care este de presupus că p.p. este contaminat se pot folosi metodele menţionate mai sus. Pentru izolarea *B. anthracis* se poate folosi un mediu cu polimixină B, lizozim, EDTA şi acetat de thaliu, mediul PLET.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-pozitivi cu dimensiuni de 1-1,5 μm/3-10 μm, formând lanţuri lungi; începe procesul de sporogeneză (sporul este oval, situat central, mai mic decât grosimea bacilului respectiv).
- Caractere de cultură:
  - Pe medii simple produc colonii de tip R, mari, cu diametrul de 2-5 mm; marginile sunt neregulate, cu prelungiri laterale filamentoase care au permis asemănarea acestora cu „capul de meduză" sau „coama de leu"; pe mediile cu sânge, poate apărea o zonă discretă de β-hemoliză deşi în mod caracteristic *B. anthracis* este non-hemolitic.
  - Pe medii speciale se poate stimula dezvoltarea capsulei polipeptidice (vezi mai jos).
  - Pe mediul PLET produc colonii mici, de tip S.
- Caractere biochimice şi de mobilitate:
  - *Bacillus anthracis* este catalazo pozitiv, produce lecitinază şi este sensibil la penicilină (faţă de majoritatea speciilor din genul *Bacillus*, rezistente la penicilină); există şi alte teste biochimice care sunt efectuate la nivelul centrului de referinţă
  - Un alt caracter care trebuie investigat se referă la motilitate, absentă în cazul *B. anthracis* şi prezentă la majoritatea speciilor din genul *Bacillus*. În acest scop putem însămânţa o coloană de geloză moale, cu incubare la 37°C pentru 1-4 zile şi urmărim dezvoltarea culturii faţă de traseul pe care am însămânţat asemănător cu interpretarea mediului MIU în cazul enterobacteriilor
- Caractere de patogenitate:
  - Testarea producerii capsulei in vitro, caracteristică tulpinilor virulente de *B. anthracis* se poate realiza prin cultivare (repicare) pe un mediu care conţine bicarbonat de sodiu (0,7%), la 37°C şi în prezenţa unui procent crescut de CO_2; după 24 de ore, tulpinile capsulate vor produce colonii mucoide iar prezenţa capsulei se va demonstra microscopic (ex. coloraţia McFadyean sau Giemsa).
  - Testarea patogenităţii la şoarecele alb (vezi capitolul 11).
- Testarea sensibilităţii la bacteriofagul γ
- Alte caractere/teste utilizate în identificare la nivelul centrelor de referinţă:
  - diferite alte teste biochimice
  - examene microscopice (frotiuri colorate cu negru Sudan pentru identificarea prezenţei globulelor lipidice de β-hidroxibutirat)

- alte teste pentru demonstrarea sensibilității la penicilină (ex. testul colierului de perle)
- tehnici ale biologiei moleculare (depistarea prezenței plasmidelor pX01 și pX02).

5. Antibiograma (verificarea sensibilității la antibiotice și chimioterapice) nu este necesară. *Bacillus anthracis* este sensibil la penicilină, eritromicină, tetraciclină, cloramfenicol, ciprofloxacină etc.

În ceea ce privește **diagnosticul imunobiologic**, în România a fost pusă la punct tehnica IDR cu antraxină (Bălteanu-Toma).

Trebuie menționat faptul că este de o deosebită importanță punerea diagnosticului de antrax la animale (în special ierbivore), principalul rezervor pentru *Bacillus anthracis*.

În acest scop, se pot utilizat tehnici ale diagnosticului bacteriologic (evidențierea microscopică a bacililor în leziuni, obținerea de culturi, identificarea antigenelor prin reacții de precipitare sau tehnici de tip ELISA; pentru reacția Ascoli, vezi capitolul 16) sau ale diagnosticului imunologic (intradermoreacția cu antraxină).

44. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *CLOSTRIDIUM*

Genul *Clostridium* include peste 100 de specii care se găsesc în intestinul animalelor şi se pot elimina în mediul exterior prin materiile fecale, sporulând. Sunt bacili gram pozitivi (uneori „la limită"), de dimensiuni mari, aşezaţi în perechi sau lanţuri, mobili cu cili peritrichi (cu excepţia *C. perfringens).* Multe dintre specii sintetizează exotoxine. În cele ce urmează vom discuta despre speciile care produc tetanos, botulism şi gangrenă gazoasă.

Tetanosul este produs de *Clostridium tetani* patogen prin multiplicare la poarta de intrare şi toxinogeneză (produce o exotoxină neurotropă). Neuronii motori spinali sunt de obicei inhibaţi de către glicină şi acidul γ aminobutiric. Toxina blochează eliberarea acestor mediatori ceea ce determină excitarea neuronilor motori spinali, cu apariţia de spasme severe şi dureroase ale musculaturii striate (paralizie spastică). Conştienţa este păstrată. Toxina poate ajunge la nivelul SNC şi retrograd prin propagare pe cale axonală de la poarta de intrare sau pe cale sangvină. Clinic, la 4-5 zile de la contaminare apar spasme ale musculaturii din zona contaminată, apoi ale muşchilor masticatori, manifestate prin trismus (gura nu se mai poate deschide) şi facies de tip risus sardonicus (spasme ale musculaturii faciale). Orice stimul extern precipită un atac de tetanos. Moartea se poate produce prin asfixie; mortalitatea este de circa 50%.

Botulismul apare de obicei prin ingestia de alimente care conţin toxina produsă de *Clostridium botulinum,* fiind o toxiinfecţie alimentară de tip toxic (toxină preformată în aliment). Toxina botulinică este cea mai puternică otravă cunoscută; doza letală pentru om este de circa 1-2 μg. După ingerare, toxina se resoarbe la nivel intestinal, ajunge în circulaţie, iar pe această cale la nivelul plăcilor neuromotorii unde împiedică eliberarea de acetilcolină (determină paralizie flască). Paralizia începe la extremitatea cefalică (ex. paralizia muşchilor globilor oculari care apare la 18-24 ore de la ingestie şi se manifestă prin diplopie) şi evoluează descendent. Decesul poate surveni prin asfixie (datorită paraliziei muşchilor respiratori). Botulismul infantil (posibil şi la adulţi) este urmare a formării toxinei botulinice prin germinarea la nivel intestinal a sporilor ingeraţi. Mortalitatea în botulismul neo-natal este foarte mare. Botulismul plăgilor poate apărea la persoane care folosesc droguri injectate intravenos sau prezintă leziuni contaminate cu pământ.

Gangrena gazoasă este produsă de două sau mai multe dintre următoarele specii: *C. perfringens, C. novyi (C. oedematiens), C. septicum, C. histolyticum* şi *C. sporogenes.* Sporii clostridieni ajung la nivel tisular prin contaminarea unor leziuni (traume). În condiţii de anaerobioză sporii germinează, formele vegetative se multiplică, fermentează zaharuri şi apare gaz. Distensia tisulară, obstrucţia mecanică a structurilor vasculare în conjuncţie cu sinteza de toxine favorizează diseminarea infecţiei. Enzimele (toxinele) produse contribuie şi la alterarea gravă a stării generale. Gangrena gazoasă este caracterizată prin edeme dure, crepitante (datorită prezenţei de gaz) şi necroză. Necroza tisulară se extinde, multiplicarea

bacteriană se amplifică, apare anemie hemolitică, toxemie şi evoluţie (în 20-80% din cazuri) către deces.

Înainte de a discuta câteva aspecte legate de diagnosticul infecţiilor produse de clostridii dorim să menţionăm faptul că există şi alte microorganisme anaerobe de interes medical (bacili gram pozitivi nesporulaţi, bacili gram negativi, coci gram pozitivi şi gram negativi, spirochete). **Diagnosticul de laborator al infecţiilor produse de germenii anaerobi** este **laborios, costisitor** şi de regulă poate fi definitivat numai în **laboratoare specializate;** sunt necesare dotări speciale şi un personal medical cu experienţă.

În continuare vom prezenta câteva aspecte privind diagnosticul de laborator în infecţiile produse de microorganismele din genul *Clostridium.*

1. Etapa de **recoltare şi transport a p.p.** este **esenţială;** trebuie menţinute condiţiile de **anaerobioză.**

2. Din punct de vedere **macroscopic** am putea remarca mirosul putrid al p.p., prezenţa unor fragmente de ţesut necrotic, a unor secreţii de culoare închisă, existenţa de sânge şi puroi în plagă etc.

Examenul **microscopic** are rol orientativ (pentru majoritatea laboratoarelor este şi ultima activitate care poate fi realizată atunci când agentul etiologic este un microorganism anaerob). *C. tetani* are dimensiuni de 0,5-2 μm/2-18 μm şi poate prezenta un spor rotund localizat terminal, *C. botulinum* are dimensiuni de 0,5-1,5 μm/3-20 μm şi poate prezenta un spor oval localizat central sau subterminal iar *C. perfringens* are dimensiuni de 0,5-1,5 μm/1,5-19 μm şi poate prezenta un spor oval localizat subterminal. Examenul microscopic poate permite în acelaşi timp un control al calităţii p.p. (evidenţiind prezenţa celulelor inflamatorii şi a celulelor lezate) şi ar putea servi la alegerea terapiei antimicrobiene.

3. Pentru **cultivarea** p.p. vom pregăti cel puţin 3 medii de cultură: bulion VF (viande-foi) cu acid tioglicolic şi albastru de metilen (care testează digestia cărnii de către clostridii), mediul geloză - sânge suplimentat cu neomicină 100 μg/ml incubat în anaerobioză şi mediul geloză - sânge incubat în condiţii aerobe. Pentru p.p. provenite din abcese sau din plăgi care sugerează gangrena gazoasă am putea folosi şi mediul Nagler (cu gălbenuş de ou) care permite evaluarea producerii de lecitinază şi lipază.

Pentru a distruge formele vegetative şi a reţine sporii putem proceda aşa cum am arătat în capitolul 10 (tehnici de izolare speciale).

Incubarea în condiţii de anaerobioză durează 24-48 de ore la 35-37°C.

Înainte de a trece la etapa de identificare trebuie să încercăm să dovedim că am izolat germeni anaerobi şi să verificăm puritatea culturii care urmează a fi identificată. În condiţiile în care p.p. a fost însămânţat pe 2 plăci cu geloză - sânge incubate aerob şi anaerob, este util să realizăm examenul microscopic al coloniilor. Dacă apar colonii asemănătoare în ambele plăci iar din punct de vedere microscopic prezintă caractere similare, este vorba de microorganisme facultativ anaerobe. Dacă pe frotiurile din coloniile izolate pe mediul incubat în anaerobioză apar şi alte tipuri morfologice, înseamnă că există microorganisme strict anaerobe. Pentru a verifica puritatea culturii obţinute, înainte de a trece la etapa de identificare, repicăm coloniile suspecte în bulion VF regenerat (prelevăm colonia prin decupare cu geloza subiacentă). Incubăm timp de 24 ore la 35-37°C. În cazul în care există multiplicare bacteriană procedăm

la a. realizarea unui frotiu colorat Gram (şi comparăm rezultatele cu cele obţinute anterior); b. repicarea pe o pantă de geloză nutritivă cu incubare în aerobioză (nu trebuie să apară cultură bacteriană în cazul în care bacteriile izolate anterior sunt anaerobe). Dacă rezultatele sunt corecte, trecem la identificarea microorganismelor.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere, aşa cum am discutat şi în capitolele precedente.

- Caractere morfotinctoriale: Sunt bacili gram-pozitivi cu dimensiunile menţionate mai sus. În culturi învechite bacteriile pot fi gram negative şi se pot detecta endosporii (deformează bacilii). În cazul în care la examenul microscopic nu evidenţiem spori vom repica pe mediul Nagler, cu incubare 48 de ore la 35-36°C şi apoi la temperatura camerei. Urmărim sporularea pe un nou frotiu colorat Gram. Putem evalua fenomenul de sporogeneză şi prin metode de cultură (vezi mai jos).
- Caractere de cultură: Speciile **mobile** (marea majoritate) formează la suprafaţa mediului colonii de tip S, cu margini ondulate, neregulate, cu tendinţă de invadare a mediului (datorită mobilităţii). În jurul coloniilor remarcăm prezenţa β-hemolizei. Dacă a avut loc inocularea şi în profunzimea mediului, coloniile au aspect pufos. *Clostridium perfringens* (specia **imobilă**) formează colonii de dimensiuni mari, de tip S, rotunde, cu margini regulate, convexe dar care pot avea şi aspect rugos. Majoritatea tulpinilor produc hemoliză dublă (zona internă, de β-hemoliză, este mai îngustă în timp ce zona externă, de α-hemoliză este mai largă); există şi tulpini care produc zone foarte largi de hemoliză precum şi tulpini slab hemolitice. Aşa cum am menţionat, prin cultivare putem să evaluăm fenomenul de sporogeneză (cunoscut fiind că sporii rezistă timp de 10 minute la temperatura de 80°C). Dacă pe frotiul din cultură colorat Gram nu evidenţiem spori, pregătim 2 tuburi cu bulion peptonă, glucoză, amidon şi extract de levură. Repicăm coloniile suspecte în cele 2 tuburi iar unul dintre tuburi în supunem unei temperaturi de 80°C, 10 minute. Incubăm cele 2 tuburi la 35-37°C până apare multiplicarea bacteriană. Dacă bacteriile se dezvoltă în ambele tuburi, am dovedit existenţa sporilor. Dacă după o incubare de cel mult 10 zile nu apare multiplicare bacteriană în tubul supus la temperatură, nu există spori.
- Caractere biochimice: Există numeroase caractere biochimice care pot fi utile în diferenţierea speciilor de clostridii.
    - În identificarea microorganismelor din acest gen utilizăm iniţial testarea producerii de lecitinază şi lipază. Pe mediul Nagler inoculăm tulpina în striu (se pot testa concomitent mai multe tulpini). Pentru aprecierea producerii de lecitinază incubarea durează 48 de ore. În cazul în care testul este pozitiv (precipitat opac în mediul din jurul striului de cultură) poate fi vorba de o tulpină de *C. perfringens*. Testul este negativ pentru *C. tetani* sau pentru *C. botulinum*. Pentru tulpinile lecitinază pozitive, la nivelul centrului de referinţă se mai pot testa mobilitatea, fermentarea lactozei, producerea de lipază, uree, hidroliza gelatinei, digestia cărnii etc. Pentru aprecierea producerii de lipază incubarea durează 1 săptămână. În cazul în care testul este pozitiv (film perlat, iridescent la nivelul striului de cultură şi în mediul adiacent) poate fi vorba de o tulpină de *C. botulinum*. Testul este negativ pentru *C. tetani* şi *C. perfringens*.

- Testul plăcilor semineutralizate poate fi practicat la nivelul centrului de referinţă. Folosim o placă cu mediul Nagler. Pe jumătate din placă etalăm Ac antitoxină (anti-lecitinază). După uscarea plăcii inoculăm în striuri o tulpină martor pozitiv, o tulpină martor negativ şi câteva tulpini de testat. Incubăm timp de 18-24 de ore la 35-37°C în anaerobioză. *C. perfringens* (ca şi tulpina M^+) dă un rezultat pozitiv doar pe jumătatea de placă fără anti-toxină.
- Creşterea în lapte turnesolat sau cu bromcrezol purpur *(C. perfringens* produce cheag alveolar în laptele turnesolat).
- Clostridiile sunt sensibilie la vancomicină şi rezistente la colistin. Alţi autori propun testarea sensibilităţii la metronidazol.

- Caractere antigenice: pot fi testate în centrele de referinţă.
- Alte teste care pot fi efectuate la nivelul centrelor de referinţă
  - Demonstrarea prezenţei tetanospasminei prin seroneutralizare la şoareci (un animal este protejat cu 1-2 ore înainte de test prin injectare subcutanată a 1000 de UAI de anti-toxină tetanică; injectăm la ambele animale 0,5 ml din cultura pe mediu lichid; animalul protejat supravieţuieşte, iar celălalt va prezenta semne tipice de tetanos);
  - Testarea (la om) a prezenţei anti-toxinei tetanice în titruri protective prin ELISA sau hemaglutinare ($T \geq 0{,}01$ UAI/ml).
  - Demonstrarea prezenţei toxinei botulinice în alimente, materii fecale, ser sau în medii de cultură. Spre ex. prelevăm din bulionul VF pe care am identificat multiplicarea bacteriană, centrifugăm iar supernatantul îl împărţim în 2 tuburi. Unul dintre tuburi îl supunem temperaturii de 100°C (toxina botulinică este termosensibilă). Inoculăm intraperitoneal p.p. la două loturi de şoareci. Dacă şoarecii injectaţi cu p.p. inactivat termic mor, nu este vorba de toxina botulinică. Urmărim şoarecii timp de 2-4 zile pentru a remarca apariţia semnelor de botulism (reducerea mobilităţii, respiraţii ample, contracţii ale muşchilor abdominali urmate de convulsii şi deces). Prezenţa toxinei botulinice poate fi confirmată prin seroneutralizare (protejăm spre ex. un animal de laborator cu anti-toxină de tip A şi un alt animal de laborator cu anti-toxină de tip B după care îi injectăm cu p.p. respectiv; dacă animalul seroprotejat cu anti-toxina de tip A supravieţuieşte, iar celălalt animal moare cu semne caracteristice pentru botulism, în mediul de cultură a existat *C. botulinum* de tip A)
  - Titrarea toxinei botulinice, prin metoda DL50 (folosind injectarea p.p. în vena cozii şi curbe standard pentru interpretare, pentru fiecare serotip)
  - Titrarea toxinei botulinice printr-o tehnică de tip ELISA (poate detecta 10 pg)
  - Testul inhibiţiei sialidazei, pozitiv în 2-6 ore pentru *C. perfringens* etc.

5. Antibiograma de regulă nu se realizează. Clostridiile sunt sensibile la penicilină, cefalosporine, vancomicină, tetracicline, metronidazol etc, însă tratamentul este mult mai complex; în unele dintre bolile clostridiene eficacitatea tratamentului cu antibiotice sau chimioterapice nu a fost dovedită.

45. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *TREPONEMA*

Ordinul *Spirochaetales* cuprinde două familii importante în patologia umană, familia *Spirochaetaceae* (în care se descriu genurile *Treponema* și *Borrelia)* și familia *Leptospiraceae* cu un singur gen, *Leptospira.* Genul *Treponema* include specia *Treponema pallidum* cu patru subspecii care produc infecții la om. *Treponema pallidum* subspecia *pallidum* este agentul etiologic al sifilisului.

Sifilisul poate fi congenital sau dobândit. În cazul sifilisului dobândit există mai multe stadii, respectiv stadiul primar, stadiul secundar, stadiul latent (recent, tardiv sau de durată nelimitată) și stadiul terțiar. În stadiul terțiar, în funcție de organele sau sistemele afectate putem discuta despre afectarea nervoasă (neurosifilis), cardio-vasculară etc. În mod particular se discută sifilisul congenital, sifilisul la gravide și sifilisul apărut la pacienții infectați cu HIV.

Infecția naturală cu *T. pallidum* este limitată la gazda umană. Infecția se transmite de obicei prin contact sexual, iar leziunile de primoinfecție sunt cantonate la nivelul tegumentelor și mucoaselor din zona genitală. Totuși în 10-20% din cazuri, **leziunile primare** sunt localizate la nivel rectal, perianal sau oral. Spirochetele se multiplică local la poarta de intrare, iar unele trec de bariera ganglionilor limfatici și ajung în circulație. În 2-10 săptămâni de la infecție, la locul inoculării se dezvoltă o papulă care se deprimă pentru a forma o ulcerație cu baza curată, indurată **(șancru dur)** la nivelul căreia se găsește un lichid clar, însă foarte bogat în treponeme. Această leziune „primară" se vindecă întotdeauna spontan, dar după circa 2-10 săptămâni apar **leziunile secundare,** care constau în leziuni eritematoase maculopapulare localizate oriunde pe corp și papule umede, palide (condiloame) în regiunile anogenitală, axilară și în cavitatea bucală. Pot apărea de asemenea meningita, corioretinita, hepatita, nefrita sau periostita sifilitică. Leziunile secundare se remit și ele spontan. Atât leziunile primare, cât și cele secundare sunt bogate în spirochete și foarte contagioase.

În cele ce urmează vom aborda diagnosticul de laborator în cazul sifilisului primar sau secundar. Diagnosticul pornește de la elemente clinice și epidemiologice, dar trebuie confirmat prin metode de laborator.

Diagnosticul de laborator în sifilis poate fi bacteriologic (direct) sau serologic.

Diagnosticul bacteriologic

Treponema pallidum nu poate fi cultivată pe medii artificiale, în laborator. Din acest motiv, diagnosticul bacteriologic cuprinde numai primele etape din structura clasică a schemei diagnosticului direct. Diagnosticul bacteriologic poate fi realizat atât în sifilisul primar cât și în sifilisul secundar.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii și

înainte de iniţierea antibioterapiei, având o serie de particularităţi. Produsul patologic poate fi reprezentat de lichidul clar (serozitatea) de la nivelul leziunilor primare în funcţie de localizare (penian, cervical, vaginal, perianal etc) sau poate fi recoltat de la nivelul leziunilor secundare (condiloma lata, rozeole sifilitice etc), de la nivelul unor leziuni „umede" bogate în treponeme în cazul sifilisului congenital timpuriu sau poate fi prelevat din ganglionii limfatici regionali. În cazul şancrului, vom recolta p.p. după îndepărtarea cu grijă (fără a produce sângerare) a crustelor care acoperă leziunea. Ar putea fi necesar să comprimăm baza leziunii pentru a stimula acumularea de lichid (clar) din care vom efectua 2-3 preparate microscopice. Prelevăm lichidul fie cu ajutorul ansei bacteriologice, fie cu ajutorul unei pipete Pasteur, fie aplicând pur şi simplu lama de sticlă pe „leziunea umedă". Acoperim cu o lamelă şi eliminăm prin uşoară apăsare eventualele bule de aer. Transportul trebuie să fie realizat foarte rapid, de preferat în maxim 20 de minute astfel încât se recomandă ca recoltarea să fie realizată într-un spaţiu corespunzător, în imediata vecinătate a laboratorului. Este o etapă **esenţială**.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic se poate realiza fie cu ajutorul microscopului cu fond întunecat, fie prin imunofluorescenţă directă (există şi alte tehnici, care nu vor fi discutate în acest manual).

- Pentru **examenul microscopic pe fond întunecat,** pregătim 2 lame (preferabil 3) pentru fiecare leziune pe care dorim să o examinăm. Preparatele nu trebuie să conţină hematii, leucocite, fragmente de ţesut sau bule de aer. În timp ce examinăm primul preparat microscopic vom introduce celelalte 2 preparate într-o cutie Petri în care există puţină vată sau hârtie de filtru umezită, pentru a păstra atmosfera umedă şi a preveni uscarea. Preparatul microscopic trebuie examinat sistematic (minim 10 minute în cazul unui rezultat aparent negativ), iniţial cu obiectivul uscat, ulterior, după vizualizarea unor microorganisme care par să aparţină genului *Treponema*, cu obiectivul de imersie. Este necesar ca examinatorul să aibă experienţă în acest tip de examinare. Microorganismele caracteristice sunt foarte subţiri şi lungi (0,25-0,3 μm/6-14 μm), spiralate, prezentând 8-14 spire (regulate, strânse, adânci şi rigide), mobile (spirele nu se deformează), deplasarea în câmpul microscopic nu este foarte rapidă dar seamănă cu o mişcare de înşurubare (există şi microorganisme care sunt imobile dar păstrează mişcările de translaţie, rotaţie lentă, flexie uşoară de la un cap la celălalt sau flexie mediană cu revenire ca un resort), luminoase pe fondul negru al câmpului microscopic. În cazul unui rezultat negativ putem repeta recoltarea şi examinarea; în anumite situaţii se poate recomanda începerea tratamentului, iar evoluţia va fi monitorizată clinic şi serologic (rezultatul negativ nu elimină diagnosticul de sifilis). Rezultatul pozitiv, atunci când poate fi exclusă prezenţa unor treponeme saprofite, pune diagnosticul de sifilis primar înainte ca anticorpii să poată fi detectaţi serologic.
- **Imunofluorescenţa directă** permite diferenţierea *T. pallidum* de alte treponeme cu ajutorul anticorpilor marcaţi fluorescent (reacţie Ag-Ac); un alt avantaj este reprezentat de faptul că nu este necesar ca treponemele să fie mobile. În plus, pentru că reacţia este specifică, se poate utiliza cu succes şi în cazul unor leziuni foarte probabil contaminate cu treponeme saprofite (ex. orale, rectale). În cazul în care examinarea nu poate fi realizată imediat secreţia poate fi recoltată într-un tub capilar care se închide la flacără şi poate fi transportat la +4°C; alternativ putem realiza frotiul, aşteptăm să se usuce în

vecinătatea becului de gaz şi putem să îl trimitem către laborator. Frotiul poate fi „colorat":

- cu Ac anti-*T. pallidum* obţinuţi de la pacienţi cu sifilis sau de la iepuri infectaţi cu *T. pallidum;* serul este tratat pentru creşterea specificităţii cu tulpina Reiter (o tulpină nepatogenă de *T. phagadenis),* iar Ac sunt apoi marcaţi cu izotiocianat de fluoresceină **sau**
- cu Ac monoclonali anti-*T. pallidum* subspecia *pallidum* marcaţi fluorescent.

Subliniem încă odată importanţa examenului clinic urmat de recoltarea, transportul şi examinarea microscopică a p.p.

În laboratoarele de referinţă ar mai putea fi utilizate şi alte metode în scop diagnostic (mai rar) sau pentru cercetare.

- Inocularea p.p. la animale de laborator reprezintă cea mai sensibilă metodă pentru detectarea *T. pallidum.* Pentru menţinerea în laborator a unor treponeme viabile sau pentru determinarea infectivităţii au fost utilizate diferite animale (hamsteri, cimpanzei etc) însă cel mai util este iepurele. Iepurele poate fi inoculat (intratesticular sau cutanat) cu orice tip de p.p. cu condiţia ca între momentul recoltării şi inoculare să nu treacă mai mult de 60 minute. În caz contrar, p.p. trebuie adus rapid la o temperatură de cel puţin -78°C (ex. în azot lichid) şi menţinut astfel până în momentul inoculării. Testul infectivităţii la iepure (RIT) rămâne metoda standard; cu ajutorul RIT se apreciază sensibilitatea şi specificitatea oricărei alte metode care este propusă pentru diagnosticul sifilisului.
- În centrele de referinţă au mai fost utilizate şi tehnici ale biologiei moleculare (sondele nucleotidice, PCR). Tehnica PCR ar putea avea utilitatea diagnostică atunci când p.p. este reprezentat de lichidul amniotic.

Treponema pallidum îşi păstrează sensibilitatea la penicilină, medicament care rămâne de elecţie pentru tratamentul sifilisului. Există şi o serie de alternative, dar dorim să subliniem că în vederea tratamentului acestei maladii trebuie respectate recomandările făcute de către comisia de specialitate a ministerului sănătăţii, pentru fiecare formă de sifilis în parte.

Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic se realizează folosind antigene **nontreponemice** şi antigene **treponemice.** Testele nontreponemice (nespecifice) şi treponemice (specifice) sunt complementare; nu se exclud. Testele nontreponemice sunt utilizate în screening, diagnostic şi monitorizarea pacienţilor în cursul tratamentului. În vederea stabilirii diagnosticului vom utiliza şi testele treponemice în corelaţie cu cele nontreponemice (nici unul dintre cele două tipuri nu pot „acoperi" din punct de vedere diagnostic toate stadiile sifilisului). Cel mai frecvent utilizăm VDRL sau RPR (din prima categorie) cuplat cu TPHA sau FTA-Abs (din a doua categorie). De obicei utilizăm serul provenit de la pacientul suspect, dar în anumite situaţii testul este realizat folosind plasmă sau LCR.

A. Reacţii serologice care utilizează antigene nontreponemice

- Antigenele nontreponemice sunt lipide care pot fi extrase din diferite ţesuturi. **Cardiolipina** este un difosfatidil-glicerol. Pentru creşterea sensibilităţii, cardiolipina este cuplată cu colesterol şi lecitină. Anticorpii anti - cardiolipină au fost numiţi reagine.

Sunt depistaţi în serul pacienţilor la 2-3 săptămâni şi în LCR la 4-8 săptămâni de la debutul infecţiei, în cazurile netratate.

- Reacţia de fixarea a complementului Bordet-Wasserman (RBW) a fost utilizată o lungă perioadă de timp, începând cu 1906. Datorită faptului că RFC este o metodă laborioasă şi în special datorită apariţiei unor alte tehnici, RBW este discutată în prezent din punct de vedere istoric.
- Tehnica actuală standard este **VDRL** (Veneral Disease Research Laboratories), un test de floculare. Testele de floculare se bazează pe faptul că particulele antigenice rămân dispersate în serul normal, dar formează grunji vizibili atunci când se combină cu reaginele. Testele se pretează la automatizare şi la folosirea pentru screening datorită costului redus. O variantă economică şi elegantă este **microreacţia VDRL** care se practică în plăci cu godeuri.
  - Ag tip VDRL se prepară conform recomandărilor producătorului.
  - Pregătirea serului de cercetat include controlul aspectului serului (se clarifică prin centrifugare), inactivarea timp de 30 minute la 56°C şi o nouă centrifugare (în cazul apariţiei unor particule în suspensie). Nu vor fi testate serurile infectate sau hemolizate. În cazul în care trec mai mult de 4 ore din momentul inactivării, serul va fi inactivat din nou timp de 10 minute la 56°C.
  - Temperatura din camera de lucru trebuie să fie între 23-29°C. Testul se efectuează pe ser nediluat (pentru monitorizarea evoluţiei sub tratament se pot face diluţii binare). Se pot testa mai multe seruri concomitent şi este necesară o notare clară a godeurilor, pentru fiecare godeu în parte. Fiecare test va include martori (seruri cu reactivitate cunoscută, martor pentru Ag). În fiecare godeu punem câte 0,05 ml ser (în godeul pentru martor Ag punem soluţie salină fiziologică). După agitarea flaconului cu suspensia antigenică, utilizând o seringă cu ac calibrat depunem câte o picătură (1/60 ml) în fiecare godeu. Acoperim placa şi o aşezăm pe un agitator care poate fi reglat la 180 turaţii pe minut, pe o durată de 4 minute.
  - Citim imediat rezultatul, prin transiluminare pe fond negru, cu ajutorul unei lupe, începând cu martorii (negativ, slab pozitiv, pozitiv, martorul pentru Ag) şi continuând cu serurile de testat.
  - Rezultatul este negativ dacă lichidul nu prezintă flocoane şi este asemănător martorului negativ şi martorului Ag. Rezultatul este slab pozitiv atunci când vizualizăm flocoane de dimensiuni mici într-un lichid uşor turbid în timp ce rezultatul este intens pozitiv atunci când vizualizăm flocoane de dimensiuni mari iar lichidul este clar. Repetăm rezultatele slab pozitive sau dificil de interpretat. În cazul în care suspicionăm existenţa fenomenului de prozonă (inhibiţia totală sau parţială a floculării prin exces de Ac), vom repeta testarea pe diluţii de ser.
- Rezultatul negativ nu elimină diagnosticul de sifilis: pacientul se poate afla în perioada de incubaţie sau poate fi cazul unui sifilis latent (evidenţiabil prin TPHA). În cazul unui pacient suspect pentru sifilis primar, repetăm testul după 1 săptămână, 1 lună şi la 3 luni.

- Vom lua în considerare un rezultat pozitiv în corelaţie cu rezultatul obţinut la testul treponemic, rezultatul diagnosticului bacteriologic, elementele clinice şi epidemiologice. Un rezultat pozitiv în condiţiile în care toate celelalte date sunt negative este de obicei un rezultat fals pozitiv. Pot apărea rezultate fals pozitive la persoane cu hepatită virală acută, pneumonii virale, rujeolă, malarie, mononucleoză infecţioasă, alte infecţii virale, la persoane care au fost recent vaccinate, precum şi la persoane cu boli ale ţesutului colagen, persoane care se droghează, la persoanele în vârstă etc. Reacţiile fals pozitive pot apărea şi pe parcursul sarcinii.
- Testul VDRL semi-cantitativ, efectuat pe 2 probe consecutive de ser este util în următoarele situaţii: scăderea de 4 ori a titrului în sifilisul recent, tratat, semnifică de regulă eficacitatea tratamentului; creşterea de 4 ori a titrului sugerează o infecţie activă în evoluţie, o reinfecţie sau ineficacitatea tratamentului.

- Alte teste de floculare utilizate în practică
  - Testul **RPR** (Rapid Plasma Reagin) este executat pe carduri din material plastic pe care apar mai multe cercuri de 18 mm. Antigenul este preparat dintr-o suspensie antigenică tip VDRL modificată (pentru a elimina etapa de inactivare prin căldură). Reactivul conţine şi particule de cărbune. Antigenul RPR este amestecat cu serul de cercetat în cercul de pe card. Daca Ac anti-*T. pallidum* sunt prezenţi, se combină cu părticulele lipidice din Ag şi produc aglutinarea lor. Particulele de cărbune coaglutinează cu Ac şi duc la apariţia unor granule negre pe fondul alb al cardului. În absenţa Ac rezultă un aspect gri uniform. Testul se poate realiza calitativ şi cantitativ (diluţii de ser).
  - Testul RST (Reagin Screen Test)
  - Testul USR (Unheated Serum Reagin)
  - Testul TRUST (Toluidine Red Unheated Serum Test)
- A fost pusă la punct şi o tehnică de tip ELISA cu acest tip de antigene.
- Modul de interpretare al testelor nontreponemice depinde şi de populaţia care este testată

B. Reacţii serologice care utilizează antigene treponemice

- Au fost realizate şi tehnici serologice care utilizează antigene treponemice extrase din *T. Reiter* (specifice de grup) de tipul RFC şi CIE.
- De utilitate practică sunt reacţiile serologice care utilizează antigene treponemice extrase din tulpina Nichols de *T. pallidum*, cu o mare specificitate.
  - Pentru o lungă perioadă de timp, tehnica standard a fost testul imobilizării treponemelor (**TPI**). Tehnica a fost pusă la punct în anul 1949. Serul de cercetat era diluat şi amestecat cu complement şi treponeme vii, mobile, obţinute din şancrul testicular de la iepure. În prezenţa Ac specifici, treponemele erau imobilizate, în timp ce în lipsa acestora, mobilitatea era păstrată (examinarea se făcea cu microscopul pe fond întunecat).
  - Testele de imunofluorescenţă indirectă (Fluorescent Treponemal Antibody, **FTA**) au început să fie utilizate în 1957, serul de cercetat fiind diluat 1/5. Datorită rezultatelor fals pozitive, ulterior s-a trecut la diluarea 1/200 a serului (**FTA-200**). Din

1962 a început să fie utilizată tehnica pe care o avem la dispoziţie şi astăzi, **FTA-Abs.** Pornind de la tulpina Reiter s-a obţinut prin ultrasonicare un extract antigenic, pentru a îndepărta Ac care nu sunt specifici pentru *T. pallidum.* Probele de ser şi/sau LCR de la pacienţi sunt diluate 1/5 cu un extract care conţine Ag treponemice de grup (Reiter), comune treponemelor patogene şi comensale. Astfel sunt înlăturaţi Ac nespecifici. Există lame pe care a fost fixată tulpina Nichols de *T. pallidum.* Probele de ser şi/sau LCR absorbite şi martorii corespunzători se depun pe spoturile de pe lamă. Dacă în ser/LCR există Ac specifici, aceştia se vor lega de treponemele fixate pe lamă formând complexe antigen-anticorp. După îndepărtarea materialului nelegat prin spălări repetate, Ac legaţi se detectează prin incubare cu un conjugat fluorescent anti Ig umane. După îndepărtarea prin spălare a conjugatului nelegat de complexele antigen-anticorp, lamele se examinează la microscopul cu fluorescenţă (UV). În cazul în care serul de cercetat este pozitiv, treponemele de pe lamă apar fluorescente (galben verzui).

- Testul de hemaglutinare *(Treponema pallidum* Hemagglutination Test, **TPHA)** a fost pus la punct în urmă cu 30 de ani. În prezenţa unor Ac faţă de Ag adsorbite pe membrana lor, hematiile aglutinează în reţele caracteristice formate din complexe imune. Ag treponemic este extras din tulpina Nichols şi adsorbit pe suprafaţa hematiilor de oaie sau pasăre fixate (hematii sensibilizate). Drept martor sunt folosite hematii fără Ag treponemice (nesensibilizate). În cazul în care în serul de cercetat sunt prezenţi Ac anti-*T. pallidum,* hematiile sensibilizate aglutinează; hematiile nesensibilizate nu aglutinează şi se depun sub forma unui „buton" pe fundul godeului. Pentru creşterea specificităţii, majoritatea truselor comerciale includ în diluent un extract de treponeme nepatogene. Testul poate fi realizat calitativ sau semi-cantitativ (diluţii ale serului de cercetat). Există metode automate, utilizate pentru testarea sângelui donat.
- Tehnica ELISA
- Tehnica ELISA pentru detectarea Ac de tip IgM anti-T. pallidum; este utilă pentru documentarea infecţie intra-uterine.
- Tehnica Western blot poate detecta atât Ac de tip IgM cât şi de tip IgG.

Aşa cum am mai menţionat, interpretarea rezultatelor obţinute se face ţinând cont de contextul clinic, epidemiologic şi de laborator. Luând în considerare numai rezultatele de laborator pentru testele menţionate în acest capitol, ar putea rezulta mai multe variante. Spre exemplu, dacă testul VDRL este negativ şi testul TPHA este tot negativ, de regulă infecţia este exclusă. Dacă ne gândim că pacientul este la debutul bolii iar anticorpii sunt încă nedectabili, repetăm testele după 3 săptămâni. În cazul în care testul VDRL este pozitiv iar testul TPHA este negativ, este posibil să ne aflăm în situaţia de mai sus, la debutul bolii şi repetăm testele după 3 săptămâni. Dacă rezultatele rămân nemodificate, este vorba de o reacţie fals pozitivă. Pot fi luate în discuţie şi alte posibilităţi.

46 DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *LEPTOSPIRA*

Genul *Leptospira* include mai multe specii, dintre care mai cunoscute sunt *L. interrogans* şi *L. biflexa.* Leptospirele sunt spirochete foarte mobile, descriind mişcări de burghiu imprimate de dispoziţia particulară a flagelilor, cu dimensiuni de 0,1 μm/6-15 μm, prezentând un „cârlig" la unul sau la ambele capete. În cadrul speciei *Leptospira interrogans* există peste 218 serotipuri (serovaruri în terminologia anglo-saxonă, de ex. *L. icterohaemorrhagiae;* un serovar include mai multe grupe) care pot determina boala la animale şi accidental la om. Specia *Leptospira biflexa* reuneşte peste 63 de serotipuri saprofite.

L. interrogans este patogenă prin multiplicare şi invazivitate. Leptospiroza se caracterizează prin polimorfism, pe parcursul evoluţiei aspectul clinic putându-se modifica. După o perioadă de incubaţie de 1-2 săptămâni, debutul bolii poate fi marcat de febră, perioadă în care leptospira este prezentă în sânge. Microorganismul se cantonează apoi în organele parenchimatoase (ficat şi rinichi), în forma cea mai gravă (sindromul Weil) putând determina apariţia de icter, hemoragii, necroză tisulară şi disfuncţii de organ. Boala este frecvent bifazică (după o ameliorare iniţială urmează faza a doua a bolii remarcându-se creşterea titrului de anticorpi de tip IgM). Infecţia leptospirotică poate conduce relativ frecvent la meningită „aseptică" (cu lichid clar).

Diagnosticul porneşte de la elemente clinice şi epidemiologice.

Diagnosticul de laborator în leptospiroză poate fi bacteriologic şi/sau serologic.

Diagnosticul bacteriologic este relativ dificil, laborios, costisitor şi este cel mai frecvent realizat la nivelul centrului de referinţă.

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii şi înainte de iniţierea antibioterapiei. Produsul patologic poate fi reprezentat de sânge sau LCR (în primele 7-10 zile), urină (după 9 zile de la debut până la 2-8 săptămâni de boală), dar s-ar putea recolta şi lichid peritoneal, pleural etc. Datorită fragilităţii leptospirelor şi fenomenului de autoliză, transportul trebuie să fie realizat rapid, în maxim 1-3 ore, la temperatura camerei.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea unui preparat proaspăt (fără a folosi însă lamela). Preparatul se examinează la microscopul cu fond întunecat. Există o serie de proceduri utilizate pentru pregătirea preparatului. În cazul lichidului peritoneal, LCR etc, produsul de centrifughează la 1.500×g pentru o durată de 30 minute, utilizându-se sedimentul obţinut. În cazul sângelui, recoltarea se face pe anticoagulant (dar nu cu citrat), urmând o primă centrifugare la 500×g pentru o durată de 5 minute. Preluăm supernatantul pe care îl centrifugăm la 1.500×g pentru o durată de 30 minute şi utilizăm sedimentul obţinut. În aceste condiţii, un medic microbiolog cu **experienţă** ar putea stabili diagnosticul prezumtiv. Leptospirele apar ca filamente luminoase, spiralate, foarte

mobile, cu mişcări de înşurubare şi flexiune, dar şi cu o uşoară deplasare în spaţiu, pe fondul negru al preparatului.

Unii autori recomandă realizarea de frotiuri colorate Giemsa prelungit sau prin impregnare argentică (Fontana-Tribondeau), mai ales pentru preparatele histo-patologice; leptospirele apar ca filamente regulat spiralate cu extremităţile fin îngroşate sub formă de "buton", de culoare maro. A fost recomandată şi colorarea imunofluorescentă (IF directă) în cazul suspicionării diagnosticului de leptospiroză. În ultima perioadă, pornind de la p.p. (ser, urină, LCR etc) au fost puse la punct tehnici PCR.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează dificil, cu costuri ridicate, datorită sensibilităţii în mediul extern şi particularităţilor de multiplicare a leptospirelor. De regulă cultivarea se face la nivelul centrului de referinţă; utilizând medii de cultură lichide nu obţinem colonii izolate.

Există şi posibilitatea inoculării p.p. la cobai sau alt animal de laborator, intraperitoneal. Starea clinică trebuie monitorizată zilnic. Identificarea infecţiei se poate face prin diagnostic serologic, prin izolarea leptospirelor (hemocultură) sau anatomopatologic şi bacteriologic după decesul sau sacrificarea animalului respectiv.

În cazul utilizării mediilor de cultură este recomandat ca toate p.p. să fie însămânţate atât pe medii de cultură selective cât şi neselective. Mediul de cultură cel mai cunoscut este mediul Korthof (cu acizi şi alcooli graşi, care conţine şi ser de iepure), pregătind în acest scop mai multe tuburi în care însămânţăm cantităţi progresive de p.p. (ex. pornim de la o picătură, continuăm cu 2 picături etc). Mediile selective includ neomicină şi/sau 5-fluorouracil.

Realizăm incubarea la 28°C. Multiplicarea bacteriană nu determină o tulburare a mediului (apariţia turbidităţii reprezintă cel mai frecvent o contaminare cu o altă bacterie). După 3 zile, respectând cu stricteţe normele de asepsie, realizăm preparate native pe care le examinăm la microscopul cu fondul întunecat. În cazul în care rezultatul este negativ, repetăm această examinare la interval de circa 3 zile pentru o durată totală de minim 4 săptămâni, sau până la obţinerea unui rezultat pozitiv. În general creşterea bacteriană are loc în 3-14 zile de la momentul însămânţării.

Costul şi durata diagnosticului cresc şi datorită faptului că pentru identificare sunt necesare cel puţin 1-2 repicări pe un alt mediu lichid, după detectarea microscopică a unor microorganisme care ar putea fi implicate patogenic. O alternativă (şi mai costisitoare, utilizată mai ales dacă presupunem contaminarea culturii cu o altă bacterie) este reprezentată de inocularea intraperitoneală a culturii respective la cobai. După 30-60 minute, având în vedere faptul că leptospirele invadează sistemul circulator mai rapid în comparaţie cu alte bacterii, după anestezierea animalului se recoltează sânge (prin puncţie cardiacă) şi realizăm o hemocultură.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Realizăm un preparat proaspăt (fără a folosi lamela) din mediul de cultură şi îl examinăm la microscopul cu fond întunecat. Leptospirele cu dimensiuni de 0,1 μm/6-15 μm, apar ca filamente luminoase, spiralate, foarte mobile, cu mişcări de înşurubare şi flexiune, dar şi cu o uşoară deplasare în spaţiu, pe fondul

negru al preparatului. Se pot realiza frotiuri colorate Giemsa prelungit sau prin impregnare argentică (Fontana-Tribondeau) precum şi prin IF directă.

- Caractere de cultură:
  - Leptospirele nepatogene se multiplică la 11-13°C în timp ce *L. interrogans* nu.
- Caractere biochimice:
  - Leptospirele nepatogene sunt rezistente la 8-azaguanină în timp ce *L. interrogans* este sensibilă
- Caractere antigenice:
  - Se utilizează seruri de referinţă cu anticorpi faţă de serogrupurile cunoscute şi tulpina de identificat izolată în cultură pură şi concentrată la o densitate standard, prin reacţii de aglutinare microscopică, la nivelul centrului de referinţă care a elaborat protocolul standard de operare; în mod similar se poate identifica şi serovarul implicat
- Alte caractere/teste utilizate în identificare la nivelul centrelor de referinţă:
  - tehnici ale biologiei moleculare (amplificarea prin PCR a fragmentelor obţinute prin restricţie endonucleazică etc).

5. Antibiograma nu se realizează (nu a fost pusă la punct o tehnică în acest scop). Este cunoscut faptul că leptospirele sunt sensibile la penicilină, amoxicilină, tetraciclină, doxiciclină etc dar tratamentul se stabileşte în funcţie de forma şi gravitatea bolii.

Diagnosticul serologic

Anticorpii specifici se pot evidenţia în serul pacienţilor începând cu a 4-6 -a zi de la debutul bolii, atingând un nivel maxim între săptămâna a 3-6 -a de boală, după care scad progresiv. Tehnica de referinţă este reprezentată de reacţia de aglutinare microscopică, realizată pe seruri pereche (primul recoltat la 1-2 săptămâni de la debut, al doilea recoltat la 3-4 săptămâni de la debut). O creştere de 4 ori a titrului la a doua determinare semnifică un diagnostic pozitiv. Un titru $\geq$ 1/800 în prezenţa unor semne clinice este foarte sugestiv. Trebuie să menţionăm că pentru unii pacienţi seroconversia are loc mai tardiv. O altă problemă este reprezentată de faptul că se utilizează leptospire vii în calitate de Ag cunoscut, motiv pentru care această reacţie nu se poate practica decât în centrul de referinţă.

La nivelul altor unităţi sanitare se pot practica reacţii de tip ELISA, reacţia de hemaglutinare indirectă sau reacţia de aglutinare pe lamă utilizând Ag preparate din tulpini saprofite (sensibilitatea şi specificitatea acestor reacţii este mai scăzută). Tehnica ELISA de identificare a anticorpilor de tip IgM pune diagnosticul infecţiei acute dar nu poate permite determinarea serogrupului implicat aşa cum se întâmplă în cazul tehnicii de referinţă.

47 DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *BORRELIA*

Genul *Borrelia* include spirochete de dimensiuni mai mari (0,2-0,5 μm/8-30 μm), cu spire largi și inegale, mobile (cu mișcări de rotație și răsucire), care infectează în special animalele și se transmit la om prin intermediul unor vectori. Produc spre exemplu febra recurentă, boală transmisă de artropodele hematofage, borrelioza Lyme etc. Borreliozele transmise prin căpușe sau păduche poartă de obicei numele regiunii geografice în care se găsesc preponderent. Vom discuta în cele ce urmează aspecte legate de **febra recurentă** cu agent etiologic *Borrelia recurrentis*, care produce infecții și în Europa.

B. recurrentis supraviețuiește mai multe luni în sângele contaminat sau în culturi la 4°C. În anumite căpușe, bacteriile sunt transferate din generație în generație. Tulpinile de *B. recurrentis* izolate în diverse părți ale lumii, de la diferite gazde și de la vectori diferiți (căpușe sau purici) au primit denumiri variate sau au fost catalogate drept subtipuri ale speciei principale. În urma infecției apare un răspuns imun umoral, putând fi detectați anticorpi aglutinanți și anticorpi fixatori de complement. De remarcat faptul că, inclusiv în decursul unei singure infecții apar modificări antigenice, care explică recăderile. Ultima vindecare (după 3-10 recăderi) este asociată cu prezența anticorpilor împotriva mai multor variante antigenice. Imunitatea consecutivă infecției este de obicei de scurtă durată.

După o perioadă de incubație (3-10 zile), debutul este brusc, cu frisoane și creșterea rapidă a temperaturii. Se asociază cefalee severă, mialgii, artralgii, letargie, fotofobie și tuse cu sau fără expectorație. În acest timp, spirochetele se află în număr mare în sânge. Pot apărea hemoragii (peteșii, epistaxis etc) dar de regulă fără evoluție fatală. Febra persistă 3-6 zile, apoi scade. Perioada afebrilă durează 4-10 zile și este urmată de un al doilea atac de frisoane, febră, cefalee intensă și stare de rău. Pot apărea succesiv până la 10 asemenea recăderi, a căror severitate scade în general progresiv. Puseele febrile se asociază cu bacteriemie.

Diagnosticul borreliozelor pornește de la elemente clinice, epidemiologice, anumite date de laborator și este confirmat prin **diagnostic bacteriologic.**

Diagnosticul de laborator în borrelioza recurentă este bacteriologic, direct urmând etapele cunoscute. Diagnosticul serologic poate oferi unele date.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii și înainte de inițierea antibioterapiei. Produsul patologic este reprezentat cel mai frecvent de **sânge** dar s-ar putea recolta și vectori (păduchi, căpușe) sau LCR, lichid sinovial etc, în funcție de manifestarea clinică. Sângele **trebuie** recoltat în perioadele febrile. În cazul în care produsele nu se pot examina imediat, recomandăm transportul acestora la temperatura frigiderului (+4°C) sau inocularea unor animale receptive (ex. șoareci) și transportul acestora către laborator.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea unui preparat proaspăt între lamă şi lamelă utilizând sângele ca p.p., cu examinare la microscopul cu fond întunecat. Borreliile se văd ca spirochete luminoase de dimensiuni mari (0,2-0,5 μm/8-30 μm), cu spire largi şi inegale, foarte mobile (cu mişcări de rotaţie şi răsucire), pe fondul negru al preparatului. Se pot realiza frotiuri subţiri sau examenul picăturii groase, colorate Giemsa prelungit, May-Grünwald-Giemsa sau Wright precum şi cu acridin-orange sau cu Ac monoclonali marcaţi fluorescent şi cu examinare la microscopul cu fluorescenţă. Pe frotiul colorat Giemsa prelungit spirochetele apar albastre, lungi, cu capetele efilate, situate printre hematii. Examenul microscopic realizat de către un medic experimentat permite identificarea borreliilor în circa 70% dintre cazuri, în condiţiile respectării normelor diagnosticului bacteriologic.

Preparatele microscopice ar mai putea fi realizate pornind de la hemolimfa vectorilor infectaţi (păduche, căpuşă). De menţionat faptul că în cazul acestui p.p. borreliile îşi menţin pentru o lungă durată de timp forma şi mobilitatea caracteristice în timp ce în sângele recoltat de la gazda umană suferă modificări datorită prezenţei anticorpilor specifici, iar în timp îşi pierd mobilitatea).

În ultima perioadă s-a introdus tehnica PCR pentru identificarea ADN-ului borrelian, pornind de la produsul patologic.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează de regulă la nivelul centrului de referinţă, existând mai multe tehnici care ar putea fi utilizate.

Se pot inocula intraperitoneal animale de experienţă sensibile (ex. şoareci sau şobolani). Animalele vor fi monitorizate zilnic clinic şi prin examinarea microscopică a sângelui (p.p. se poate recolta de la nivelul venei cozii). Se mai pot inocula vectori (păduchi sau căpuşe) sau ou de găină embrionat (la nivel intra alantoidian sau în membrana chorioalantoidiană).

Se pot utiliza şi medii de cultură artificiale speciale (cu agenţi reducători, N-acetilglucozamină, acizi graşi nesaturaţi cu catenă lungă, ser de iepure), în condiţii de microaerofilie, cu incubare la 32-37°C. Se recomandă şi utilizarea mediilor selective care includ o combinaţie de agenţi antimicrobieni precum rifampicină, amfotericină B şi fosfomicină. Datorită faptului că mediile de cultură sunt lichide, nu se obţin colonii izolate. Creşterea microbiană trebuie verificată prin realizare de preparate proaspete examinate la microscopul cu fond întunecat la fiecare 3 zile, pentru o durată de 2-6 săptămâni.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se poate realiza pe baza:

- Caracterelor morfotinctoriale: Sunt spirochete luminoase de dimensiuni mari (0,2-0,5 μm/8-30 μm), cu spire largi şi inegale, foarte mobile (cu mişcări de rotaţie şi răsucire), pe fondul negru al preparatului. Pe frotiul colorat Giemsa prelungit spirochetele apar albastre, lungi, cu capetele efilate.
- Caracterelor de cultură:
  - Dacă are loc multiplicarea borreliilor pe mediul de cultură acesta rămâne limpede, fără sediment, dar îşi modifică culoarea (ex. virează de la roşu-portocaliu spre rozgălbui)
- Caracterelor biochimice:
  - Borreliile sunt microaerofile, fermentează glucoza producând bioxid de carbon şi acid lactic (dar aceste teste nu sunt de regulă utilizate în diagnostic).

- Alte caractere/teste utilizate în identificare la nivelul centrelor de referinţă:
  - tehnici ale biologiei moleculare (PCR).

5. Nu a fost pusă la punct o metodă pentru realizarea antibiogramei (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice). Febra recurentă se tratează cu tetraciclină, cloramfenicol, penicilină sau eritromicină. În urma tratamentului poate apărea sindromul Jarisch-Herxheimer (frison sever, creşterea temperaturii, hipotensiune, leucopenie).

Diagnosticul serologic nu este foarte util, datorită variaţiilor antigenice (care au loc inclusiv pe parcursul bolii) şi complexităţii fenomenului de recurenţă.

În ser pot fi decelaţi anticorpi aglutinanţi, imobilizanţi şi fixatori de complement. Sunt foarte puţine laboratoare care practică aceste reacţii, de obicei în scop de cercetare. La pacienţii cu febră recurentă epidemică (purtători de păduchi) pot apărea aglutinine faţă de *Proteus* OXK şi o reacţie VDRL fals pozitivă.

Se poate înregistra o leucocitoză de până la 25.000 celule/mm^3 şi o creştere importantă a VSH-ului (de până la 110 mm/h).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

48. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN FAMILIA *RICKETTSIACEAE*

Rickettsiile sunt microorganisme care inițial au fost încadrate printre virusuri deoarece au dimensiuni mai mici decît bacteriile (600/300 nm) şi în majoritate nu se pot cultiva decât pe gazde vii. Familia *Rickettsiaceae* include trei genuri: *Rickettsia, Coxiella* şi *Ehrlichia.* Microorganismele sunt transmise de obicei de către artropode (păduche, purice, căpuşă) multiplicîndu-se în corpul acestora. Cel puțin patru rickettsii *(Rickettsia rickettsii, Rickettsia conorii, Rickettsia tsutsugamushi, Rickettsia akarii)* şi probabil şi altele sunt transmise transovarian în artropode care servesc deopotrivă ca vector şi rezervor. *Rickettsia prowazeckii,* agentul etiologic al tifosului exantematic este considerată ca specia tip a genului *Rickettsia.* În cele mai multe cazuri, rickettsiozele se caracterizează prin asocierea unui sindrom infecţios sever cu un exantem. Clasificarea lor se poate face după mai multe criterii. După principalele caractere clinice şi epidemiologice rickettsiozele se pot împărți în următoarele grupe: a). tifosul de păduche sau purice; b). grupul febrelor butonoase (febrele peteşiale) reuneşte rickettsiozele transmise prin căpuşe care parazitează animalele domestice şi sălbatice; c). grupul tifos tropical reuneşte rickettsiozele transmise de larvele unor mici acarieni. „Tifosul pulmonar" sau febra Q are ca agent etiologic *Coxiella burnetii* poate fi transmisă şi de căpuşe, contaminarea este însă posibilă şi pe cale respiratorie sau digestivă.

Microorganismele se multiplică în celulele endoteliului vaselor sanguine mici şi produc vasculite. Celulele se umflă şi se necrozează, apar tromboze ale vaselor care duc la ruptură şi necroză. Leziunile vasculare par a fi baza alterărilor hemostazei. Pot apărea coagulare intravasculară diseminată şi ocluzii vasculare. La nivel cerebral apar agregări limfocitare, leucocitare şi ale macrofagelor ceea ce conduce la apariţia „nodulilor tifici". Se observă leziuni similare în vasele mici la nivel cardiac sau la nivelul altor organe. Infecţiile rickettsiene se caracterizează prin febră, cefalee, indispoziţie, prostraţie (stare generală foarte alterată), rash (erupţie) cutanat şi mărirea splinei şi ficatului. În febra Q nu există leziuni cutanate.

Vom discuta în continuare despre diagnosticul febrei Q deşi *Coxiella burnetii* poate produce şi un sindrom febril auto-limitat (2-14 zile), endocardită, hepatită, osteomielită etc. Febra Q se poate manifesta prin pneumonie atipică, pneumonie rapid progresivă sau pneumonie în care semnul principal este reprezentat de febră (simptomatologia pulmonară fiind absentă, iar implicarea pulmonară putând fi demonstrată paraclinic). Pornim de la elemente clinice (nespecifice), paraclinice şi de laborator şi încercăm stabilirea etiologiei prin diagnostic microbiologic (bacteriologic şi serologic). Obţinerea de hemoculturi şi sputoculturi negative pentru alte microorganisme este un element care în contextul clinic şi paraclinic reprezintă un element sugestiv.

Diagnosticul bacteriologic

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii şi

înainte de iniţierea antibioterapiei. Produsul patologic este reprezentat cel mai frecvent de **spută**; putem recolta şi sânge (ar fi de preferat **cheagul sanguin**), lichid pleural, lichid pericardic, fragmente de placentă (în cazul unui avort) etc. Transportul trebuie realizat rapid şi în condiţii de **maximă siguranţă** (ceea ce trebuie respectat în **toate etapele** diagnosticului bacteriologic; microorganismele din familia *Rickettsiaceae* prezintă un grad însemnat de infecţiozitate prin aerosoli). În cazul în care p.p. nu poate fi procesat şi inoculat imediat este recomandată menţinerea la -20°C (inclusiv pe parcursul transportului).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic este rareori utilă pentru diagnostic. În spută, mai ales dacă este recoltată prin biopsie transbronşică, putem remarca prezenţa macrofagelor alveolare, iar printre acestea prezenţa unor cocobacili de dimensiuni mici. Pornind de la gena pentru superoxid-dismutază au fost obţinuţi primeri (amorse) utilizaţi în PCR, pornind de la p.p.

3. Cultivarea produsului patologic se poate realiza numai pe gazde vii, la nivelul unui laborator de referinţă. Trebuie luate toate măsurile de prevenire a unei infecţii în laborator. În afară de p.p. menţionate mai sus am putea folosi pentru inoculare şi artropode. *Coxiella burnetii* poate cultiva pe animal de laborator (cobai), culturi de celule sau ou de găină embrionat (la nivelul sacului vitelin). La nivelul sacului vitelin *C. burnetii* suferă o variaţie de fază, întrucâtva similară variaţiei de la forma S la forma R întâlnită la alte bacterii. Tulpinile recent izolate sunt în faza I în timp ce după subcultivare se obţin tulpini cu virulenţă scăzută, în faza II.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza astfel:

- Caractere morfotinctoriale:
  - evidenţierea prin imunofluorescenţă directă a microorganismelor în hemolimfa animalelor infectate sau la nivelul sacului vitelin al oului de găină embrionat;
  - realizarea de frotiuri colorate prin metoda Gimenez (microorganismele apar de culoare roşie pe fondul verde al frotiului) sau Machiavello (microorganismele apar de culoare roşie pe fondul albastru al frotiului); se poate utiliza şi metoda Giemsa;
- Evaluarea prezenţei anticorpilor anti-*C. burnetii* la animalele de laborator inoculate cu p.p.
- Tehnici ale biologiei moleculare (PCR) etc.

5. Testarea sensibilităţii la antibiotice nu se realizează de rutină. Cercetări efectuate după cultivarea *C. burnetii* pe linii de celule fibroblastice L929 au permis autorilor să afirme că tulpinile studiate au fost sensibile la chinolone (în special) şi rifampicină dar mai puţin la cloramfenicol, doxicilină şi trimetoprim. Totuşi, tratamentul febrei Q se poate face cu se face cu tetraciclină sau macrolide în asociere cu rifampicină.

Diagnosticul serologic

Datorită dificultăţii şi riscurilor diagnosticului bacteriologic, cel mai frecvent în practică se utilizează diagnosticul serologic. Există mai multe tehnici de laborator care pot fi utilizate dar RFC rămâne în continuare metoda de referinţă. O creştere de 4 ori a titrului la a 2-a determinare ajută la punerea diagnosticului pozitiv în febra Q. Mai putem utiliza reacţia de microaglutinare, reacţia de microimunofluorescenţă indirectă, o tehnică de tip ELISA sau reacţia de latexaglutinare (pozitivă în infecţia acută). Reacţia de microimunofluorescenţă

indirectă prezintă un nivel ridicat de sensibilitate şi specificitate în condiţiile în care personalul de laborator este bine pregătit şi are experienţă în acest tip de diagnostic. În ceea ce priveşte depistarea specifică a Ac de tip IgM, în acest caz nu este utilă deoarece IgM pot persista între 1 şi 2 ani după infecţia acută.

În diferite studii epidemiologice a fost utilizată şi reacţia de seroneutralizare. Injectând la şoarece ser specific anti-*C. burnetii,* acesta va neutraliza efectul inoculării de microorganisme vii pe cale intraperitoneală sau intravenoasă. **Reamintim** necesitatea luării tuturor măsurilor de prevenire a unei infecţii a personalului de laborator.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

49. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *CHLAMYDIA*

Chlamydiile sunt bacterii de dimensiuni mici (0,25-1 μm), gram negative, strict parazite, imobile, care se multiplică în citoplasma celulelor gazdă printr-un ciclu de dezvoltare caracteristic. Datorită importanței pentru diagnostic, vom prezenta ciclul de dezvoltare al chlamydiilor. După ce pătrunde în interiorul celulei gazdă, particula infecțioasă (corpusculul elementar, formă cocoidă, cu diametrul de 0,25-0,3 μm) se transformă într-o particulă mai mare (corpuscul reticulat, cu diametrul de 0,5-1 μm). Corpusculii reticulați se reunesc și se multiplică prin diviziune binară, formând colonii (**incluzii**) intracitoplasmatice. După o perioadă variabilă în funcție de specia de chlamydii și de celula parazitată, de la nivelul incluziilor apar noi corpusculi elementari, care sunt expulzați, urmând să paraziteze alte celule. Întregul ciclu durează 24-48 ore.

Genul conține trei specii care pot fi implicate în patologia umană. De regulă infecția este subclinică, boala reprezentând o excepție la gazdele naturale ale acestor germeni. Transmiterea de la păsări la om favorizează apariția bolii. *C. trachomatis* produce incluzii compacte intracitoplasmatice, cu glicogen. Include tulpini care determină pneumonie la șoarece și câteva afecțiuni umane: trahom (serovarurile A, B, Ba și C), conjunctivite, uretrite nongonococice, salpingite, cervicite, pneumonii la nou-născuți (serovarurile D-K) și limfogranulomatoza venerianã (serovarurile L_1-L_3). *C. psittaci* produce incluzii intracitoplasmatice difuze, sărace în glicogen. Include tulpini care determină psitacoza umană, ornitoze la păsări, meningită, pneumonie la feline și multe alte afecțiuni ale animalelor. (provoacă infecții la animale dar poate fi transmisă omului). *C. pneumoniae* poate provoca la gazda umană pneumonii atipice la fel ca și *C. psittaci, Coxiella burnetii* sau *Mycoplasma pneumoniae.*

Diagnosticul de laborator în infecțiile chlamydiene poate fi bacteriologic și imunologic. Infecțiozitatea (prin aerosoli) este importantă astfel că trebuie luate toate măsurile necesare pentru prevenirea apariției unor infecții la personalul de laborator.

Diagnosticul bacteriologic

Diagnosticul bacteriologic complet poate fi realizat la nivelul unor centre de referință.

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii și înainte de inițierea antibioterapiei și respectând măsurile de precauție. Produsul patologic poate fi reprezentat de raclat conjunctival sau de la nivelul altor mucoase (ex. cervivală), urină, spermă, secreție purulentă uretrală, secreții nazale, secreții faringiene, spută, aspirat ganglionar, puroi din fistulă etc. Ne vom referi în continuare la diagnosticul infecției produse de *C. trachomatis.* În cazul în care spre ex. secreția uretrală nu este evidentă, putem utiliza un tampon subțire pe care îl introducem cu blândețe 3-5 cm în uretră, rotindu-l ușor. Indiferent de p.p. recoltat, tampoanele nu trebuie să fie din vată sau alginat de calciu ci din Dacron. Produsul trebuie să fie prelucrat imediat. Dacă acest lucru nu este posibil, transportul se va face în medii speciale de transport sau la cel puțin -20°C (preferabil -70°C).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic include realizarea unor frotiuri pe care le colorăm după cum urmează. Cea mai sensibilă şi specifică metodă pentru punerea în evidenţă a incluziilor intracitoplasmatice sau corpusculilor elementari este imunofluorescenţa. Frotiul este uscat, fixat chimic (cu acetonă, la -20°C) şi „colorat" imunofluorescent (metoda directă sau indirectă). Urmărim prezenţa celulelor inflamatorii (PMN) şi a celulelor caracteristice ţesutului de la nivelul căruia am realizat recoltarea. Incluziile apar ca o masă bine definită, cu fluorescenţă de ex. galben-verzui, în interiorul celulelor epiteliale. Frotiul va fi examinat cel puţin 3 minute în cazul în care pare să fie negativ. Celelalte frotiuri le putem colora prin metoda Gimenez (corpusculii elementari apar aglomeraţi şi de culoare roşie pe fondul verde al frotiului), cu lugol (incluziile de *C. trachomatis* conţin glicogen; apar ca o masă de culoare brună) sau Machiavello (corpusculii elementari apar aglomeraţi şi de culoare roşie pe fondul albastru al frotiului). Unii autori menţionează că examenul citologic, cu punerea în evidenţă a unor limfocite „transparente" şi a unui număr crescut de histiocite este sugestiv pentru infecţia cu *C. trachomatis*. Prin tehnici de tip ELISA se pot pune în evidenţă antigene în p.p. Există şi tehnici ale biologiei moleculare care pot fi aplicate direct pe p.p. (sonde nucleotidice, PCR etc).

3. Pentru cultivarea produsului patologic am putea utiliza oul de găină embrionat (la nivelul sacului vitelin) dar de regulă se folosesc culturile de celule. Pentru *Chlamydia trachomatis* se pot utiliza liniile celulare BGMK, HeLa 229 (tratate cu dextran şi cicloheximidă), McCoy (tratate cu cicloheximidă 1 μg/ml), pentru *Chlamydia pneumoniae* se pot utiliza liniile celulare HeLa, HEp-2, pentru *Chlamydia psittaci* se poate utiliza linia celulară McCoy etc. Înainte de inocularea pe culturile de celule, p.p. este centrifugat (3000xg, timp de 60 minute). Se pot utiliza culturile de celule în sistemul clasic sau micrometoda de cultivare pe culturi de celule în godeuri. Incubarea durează 48-72 de ore. Tehnica incubării este destul de complexă (incubări repetate, în condiţii diferite) şi trebuie să respecte strict protocolul de lucru.

4. Identificarea se va realiza diferenţiat. În cazul în care s-a utilizat micrometoda, godeurile se examinează microscopic după colorare cu lugol sau prin imunofluorescenţă. În cazul cultivării prin metoda clasică, realizăm frotiuri pe care le fixăm chimic (de ex. cu metanol). Un frotiu va fi colorat cu lugol (incluziile de *C. trachomatis* conţin glicogen) iar altul cu Ac monoclonali marcaţi fluorescent. Se pot aplica şi tehnici de biologie moleculară.

5. Nu există tehnici standardizate de stabilire a sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice a tulpinilor de *Chlamydia spp.* În tratament se pot folosi eritromicina (sau alte macrolide), tetraciclinele sau fluorochinolonele.

Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic implică utilizarea reacţiei de fixare a complementului, reacţiei de microimunofluorescenţă şi a tehnicilor de tip ELISA. Se consideră că un titru 1/64 este sugestiv în timp ce o creştere de 4 ori a titrului în dinamică permite diagnosticul pozitiv. Identificarea prezenţei Ac de tip IgM la nou născuţi permite diagnosticul de pneumonie cu *C. trachomatis*. Tehnicile imunologice sunt frecvent utilizate în scop epidemiologic (studii de seroprevalenţă).

Diagnosticul imunobiologic

Utilizarea intradermoreacţiei (IDR Frei) a intrat în istoria medicinii.

50. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *MYCOPLASMA*

Clasa *Mollicutes* include patru ordine. Ordinul *Mycoplasmataceae* include genurile *Mycoplasma* (circa 100 specii) și *Ureaplasma* (6 specii). Câteva dintre speciile acestor genuri prezintă interes medical. Mycoplasmele sunt cele mai mici microorganisme care pot trăi liber în natură (125-250 nm) și se pot multiplica pe medii de laborator. *M. pneumoniae* este implicată în infecții respiratorii, *M. hominis* poate produce infecții cu localizare genitală inclusiv infecții post-abortum și post-partum în timp ce *U. urealyticum* a fost izolată din uretrite non-gonococice și din alte infecții uro-genitale.

Diagnosticul de laborator poate fi bacteriologic și/sau serologic, în funcție de localizarea infecției și specia implicată.

Diagnosticul infecțiilor respiratorii pornește de la elemente clinice și paraclinice și poate fi confirmat etiologic prin diagnosticul microbiologic.

Diagnosticul bacteriologic

1. Recoltarea și transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând regulile cunoscute (vezi capitolul 6), în special recoltarea cât mai rapid după debutul bolii și înainte de inițierea antibioterapiei. Produsul patologic poate fi reprezentat de exsudat faringian, secreții nazale, spută, secreții genitale, urină etc dar în continuare vom discuta numai diagnosticul de laborator în infecțiile respiratorii. Transportul trebuie realizat la rece (la +4°C) cât mai rapid posibil, fără a depăși un maxim de 3-4 ore de la recoltare. O alternativă este reprezentată de utilizarea mediilor speciale de transport care pot asigura conservarea p.p. pentru cel mult 24 de ore. Utilizarea azotului lichid (-70°C) permite conservarea probelor timp de mai multe zile dar nu este încă accesibilă (cu foarte puține excepții) sistemului sanitar românesc.

2. Examinarea microscopică a produsului patologic nu permite obținerea unor rezultate utile, *M. pneumoniae* ca și celelalte specii ale ordinului are dimensiuni foarte reduse. Unii autori recomandă realizarea de frotiuri colorate imunofluorescent. Pornind de la p.p. s-ar putea realiza amplificarea genetică (PCR) cu o sensibilitate foarte bună. Prin tehnici de tip ELISA pot fi puse în evidență Ag de *M. pneumoniae* în spută.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se poate realiza utilizând tehnici și medii speciale. Unul dintre mediile de cultură cunoscut este mediul îmbogățit, pe bază de infuzie de cord bovin numit generic PPLO. Acest mediu include atât substanțe nutritive, surse de energie, indicator de pH (roșu fenol) cât și substanțe care îi asigură selectivitatea (penicilină și/sau acetat de taliu). Cei mai mulți autori recomandă însămânțarea p.p. atât pe un mediu de cultură solid cât și pe un mediu de cultură lichid (ex. bulion PPLO). Vom realiza o incubare la 37°C în atmosferă de 5% CO_2 și urmărim culturile pe mediul lichid pentru a sesiza cât mai rapid (dar nu mai devreme de 48-72 ore de incubare) modificările de culoare care trădează virajul pH-ului. Mediul devine acid prin fermentarea glucozei în cel mult 3-4 săptămâni. Este recomandat să realizăm repicări pe medii solide și lichide cât mai curând după ce am observat virajul pH-ului.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caracterele morfotinctoriale **nu** sunt utile în identificarea *M. pneumoniae.*
- Caractere de cultură:
  - Se pot examina la stereomicroscop (cu mărire de minim 25×). În scopul identificării trebuie să „citim" placa cu mediu agarizat de cel puţin 2 ori pe săptămână. Pot apărea colonii de dimensiuni foarte mici (cu diametru de la 10 μm până la 200 μm), cu aspect muriform. Sunt descrise şi colonii cu aspect de „ou-ochi", cu centrul dens, opac, înconjurat de o zonă periferică mai clară pe care unii autori le consideră drept tipice pentru *Mycoplasma* (astfel de colonii ar mai putea fi produse de bacterii în formă L şi necesită realizarea diagnosticului diferenţial).
  - Se poate realiza şi cultivarea pe oul de găină embrionat (inoculare intravitelină) sau în culturi de celule.
- Caractere biochimice:
  - Fermentează glucoza, nu metabolizează arginina, nu hidrolizează ureea dar reduce (în aerobioză) tetrazoliul. Acesta este un compus incolor, iar în cazul în care este redus la formazan, culoarea devine roşie. Testul se poate realiza direct pe placa pe care presupunem prezenţa coloniilor de *M. pneumoniae.*
- Alte caractere care ar putea fi utilizate în identificare sunt
  - Fenomenul adsorbţiei hematiilor de cobai
  - Colorarea imunofluorescentă a coloniilor cu seruri specifice marcate cu fluorocromi
  - Inhibarea dezvoltării coloniilor în jurul unor discuri impregnate cu Ac specifici
  - Tehnici ale biologiei moleculare (sonde nucleotidice, PCR) etc.

5. Nu există o standardizare a tehnicilor pentru determinarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice. Tratamentul pneumoniei cu *M. pneumoniae* se poate face cu eritromicină, alte macrolide sau cu tetracicline. Durata tratamentului este de circa 3 săptămâni.

Diagnosticul serologic

În cursul infecţiei se produc Ac din diferite clase, unii fiind utili pentru neutralizarea *M. pneumoniae* în timp ce alţii acţionează ca auto-Ac. Dintre aceştia, aglutininele „la rece" sunt Ac de tip IgM oligoclonali care reacţionează cu un Ag de la suprafaţa hematiilor pacienţilor infectaţi cu *M. pneumoniae.* Cu toate că există şi alte maladii în care apar aglutinine la rece, iar pe de altă parte aceştia nu se pot identifica la toţi pacienţii infectaţi cu *M. pneumoniae,* demonstrarea aglutininelor la rece continuă să fie utilă în diagnosticul serologic. Utilizăm serul pacientului pe care îl amestecăm cu eritrocite provenite de la pacienţi de grup O, incubăm la 0°C câteva minute şi urmărim apariţia aglutinării. Dacă apare aglutinarea repetăm testul realizând diluţii de ser pentru a determina titrul. Un titru ≥ 1/32 este sugestiv pentru infecţia cu *M. pneumoniae.*

Se poate utiliza şi RFC, dar pentru că Ac fixatori de complement apar tardiv este utilă în studii epidemiologice. Tehnica de tip ELISA poate determina Ac de tip IgM şi este utilă în infecţia acută.

51. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE MICROORGANISME DIN GENUL *CANDIDA*

Sunt cunoscute câteva mii de specii de **levuri** şi **mucegaiuri**, dintre care circa 100 sunt izolate din infecţii umane sau de la animal. Genul *Candida* cuprinde peste 81 de specii dintre care 7 sunt implicate în patologia umană. Fac parte dintre **levuri**. *Candida albicans* produce pseudomicelii (pseudohife) atât în culturi, cât şi în produse patologice sau la nivel tisular. *Candida albicans* poate face parte din flora microbiană normală. Există anumiţi factori care pot precipita apariţia unei candidoze respectiv factori intrinseci (vârste extreme, sarcină, endocrinopatii, hemopatii maligne, infecţia cu HIV şi SIDA etc) şi factori extrinseci (leziuni cu diferite cauze la nivel tegumentar, tratament incorect cu antibiotice şi chimioterapice antibacteriene, terapia imunosupresivă, utilizarea pe cale generală a medicamentelor anticoncepţionale, diferite manevre medico-chirurgicale etc).

Candidozele se pot prezenta sub mai multe forme clinice. Dintre acestea, putem întâlni mai frecvent candidoze bucale şi peribucale (stomatită, glosită, cheilită, faringită, amigdalită etc), candidoze genitale (vaginite, vulvite, balanoprostatite etc), candidoze localizate la nivel cutanat sau la nivelul fanerelor (onixis şi perionixis, intertrigo axilar, submamar, interfesier, interdigital etc) dar şi candidoze localizate la nivel visceral (bronhopneumonie, endocardită, meningită, infecţii digestive, infecţii urinare etc) sau generalizate.

Diagnosticul infecţiilor fungice nu este un diagnostic facil, dar este foarte important pentru că trebuie să avem în vedere că aceste afecţiuni sunt mult mai frecvente decât sunt raportate în ţara noastră. Oricare laborator clinic ar trebui să poată realiza cel puţin examinarea microscopică în vederea evidenţierii levurilor sau structurilor miceliene sau pseudomiceliene precum şi testul filamentării. Dintre infecţiile fungice vom discuta doar despre infecţiile produse de levuri şi dintre acestea numai despre infecţiile produse de levurile din genul *Candida,* mai precis de specia *Candida albicans.*

În ceea ce priveşte diagnosticul unei infecţii cu *Candida spp.* (respectiv *C. albicans)* există anumite particularităţi de care trebuie ţinut cont atunci când se diagnostichează o candidoză localizată la nivel muco-cutanat în comparaţie cu o candidoză localizată profund. Diagnosticul poate fi micologic (direct) sau imunologic (indirect).

Diagnosticul micologic

1. Recoltarea şi transportul produsului patologic trebuie să se realizeze respectând o serie de reguli (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientul să fi primit antibiotice antifungice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie etc). În cazul candidozelor **superficiale,** după antiseptizarea suprafeţei leziunii raclăm spre ex. tegumentul şi colectăm scuamele rezultate într-un recipient. Mai putem recolta fire de păr, fragmente de unghie etc. În principiu putem introduce p.p. recoltat în pachet de hârtie, introdus la rândul lui într-o cutie Petri. Transportul trebuie să dureze maxim 48 de ore. În cazul candidozelor **profunde** ca şi în cazul candidozelor localizate la nivelul **mucoaselor** trebuie să evităm uscarea p.p. pe parcursul transportului. Vom utiliza recipiente care se pot închide ermetic şi dacă estimăm că transportul va dura

mai mult de 1-2 ore introducem în recipient un tampon de vată sau tifon umezit cu soluţie salină fiziologică. Pentru a preveni multiplicarea bacteriană putem adăuga p.p. antibiotice (ex. penicilină, streptomicină, cloramfenicol). Este bine ca volumul de p.p. recoltat să fie cât mai mare. În cazul candidozelor profunde preferăm ca recoltarea să fie urmată **imediat** de realizarea preparatelor microscopice şi însămânţare pe medii de cultură (la patul bolnavului).

2. Examinarea microscopică a produsului patologic se realizează diferit, în funcţie de p.p. prelucrat, dar face parte din orice examen micologic.

- În cazul în care examinăm o secreţie sau un produs obţinut prin raclare de la nivel tegumentar sau fragmente de unghie vom realiza un preparat proaspăt (umed), montat în soluţie de 10-30% KOH-glicerol. Putem utiliza pentru colorare calcofluor alb, un fluorocrom care permite evidenţierea levurilor datorită faptului că au în compoziţie chitină (la nivelul peretelui celular). Elementele fungice (**levuri** ovoide, cu dimensiunea de 4/6 μm, **pseudomicelii** şi **micelii**) apar galben-verzui sau alb-albăstrui în funcţie de lungimea de undă a radiaţiei de excitaţie. Punerea în evidenţă a formaţiunilor menţionate mai sus permite suspicionarea prezenţei *Candida spp.*, dar pentru confirmarea prezenţei *C. albicans* este necesară obţinerea culturilor pure şi identificarea acestora.
- În cazul în care examinăm secreţii de la nivelul mucoaselor vom pregăti atât preparate umede cât şi frotiuri pe care le vom colora (Gram, AM sau Giemsa). Pentru creşterea sensibilităţii examinării preparatelor umede, acestea vor fi colorate cu calcofluor alb sau cu lactofenol albastru cotton. Indiferent de metoda utilizată, punerea în evidenţă a levurilor şi pseudomiceliilor ridică o suspiciune, însă datorită prezenţei *Candida spp.*, în flora microbiană normală (ex. bucală, vaginală etc) doar punerea în evidenţă a **micelilor** alături de prezenţa formelor **levurice** (gram pozitive la coloraţia Gram) poate permite confirmarea infecţiei. Este necesară obţinerea culturilor pure şi identificarea acestora. Pe de altă parte, dorim să menţionăm că o cultură pozitivă în absenţa unui examen microscopic pozitiv ridică semne de întrebare privind diagnosticul infecţiei cu *C. albicans*.
- În cazul candidozelor profunde, interpretarea se va face diferenţiat. Atunci când p.p. este normal steril (recoltat prin puncţie lombară, lavaj bronho-alveolar, puncţie bioptică etc), identificarea structurilor fungice (**levuri, micelii**) este foarte importantă pentru diagnostic. Dacă p.p. este reprezentat de urină, materii fecale, spută sau alt produs potenţial contaminat de flora microbiană normală, interpretarea este mai dificilă în ceea ce priveşte semnificaţia structurilor fungice observate. Pentru examinarea p.p. recoltate de la pacienţi care prezintă candidoze profunde vom realiza atât preparate umede cât şi frotiuri fixate, colorate prin metodele amintite. Este posibil ca elementele fungice să apară deformate datorită fixării precipitatelor de colorant, pe frotiul colorat Gram. În cazul biopsiilor tisulare am putea utiliza coloraţiile histochimice.

3. Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic se realizează în aşa fel încât să se poată obţine **colonii izolate** şi respectiv o cultură pură, care se va identifica (vezi şi capitolele 9 şi 10). Există mai multe medii de cultură care pot fi utilizate. Cel mai cunoscut este mediul **Sabouraud** (agar, glucoză sau maltoză, polipeptonă) produs şi de INCDMI „Cantacuzino". În cazul p.p. contaminate vom folosi şi medii selective, de ex. mediul

Sabouraud cu antibiotice (cloramfenicol, gentamicină şi/sau tetraciclină) şi/sau mediul Sabouraud cu ciclohexiimidă. Dorim să menţionăm că în cazul p.p. necontaminate realizăm cultivarea numai pe mediul Sabouraud neselectiv în timp ce în cazul p.p. contaminate vom realiza cultivarea atât pe mediul neselectiv cât şi pe mediile selective. Putem incuba plăcile la 22-30°C, dar mai frecvent incubarea se realizează la 28°C (sau la temperatura camerei) şi la 35-37°C, timp de 24-96 ore în cazul candidozelor superficiale şi până la maxim 3 săptămâni în cazul candidozelor profunde.

4. Identificarea microorganismului implicat patogenic se va realiza pe baza mai multor caractere:

- Caractere morfotinctoriale: Examenul microscopic al culturilor de levuri se realizează asemănător cu ceea ce am discutat în cazul identificării bacteriilor. Există însă şi anumite particularităţi.
  - Vom realiza atât preparate proaspete, colorate de ex. cu lactofenol cât şi frotiuri fixate şi colorate. Vom putea remarca prezenţa levurilor (blastoconidii), rotunde, ovoide sau puţin mai alungite, gram pozitive, putând prezenta muguri şi pseudomicelii. Prin examenul microscopic dovedim şi puritatea coloniei.
  - După repicarea pe agar cu făină de porumb sau agar cu extract de cartof (medii sărace din punct de vedere nutritiv), examinarea microscopică a preparatului proaspăt va demonstra producerea de **chlamidoconidii (chlamidospori)** care apar la extremitatea pseudomicelilor. Testul este negativ în numai 3-4% dintre cazuri.
- Caractere de cultură:
  - Produc colonii de tip S, rotunde, bombate, netede, asemănătoare cu unele colonii bacteriene dar cu dimensiuni mai mari. Coloniile apar în 1-4 zile, au o culoare albă sau alb-gălbuie şi consistenţă cremoasă. În timp suprafaţa coloniilor capătă un aspect „zbârcit".
- Caractere biochimice:
  - Auxanograma: Levurile prezintă un anumit echipament enzimatic cu ajutorul căruia pot să utilizeze un anumit carbohidrat ca unică sursă de carbon. Dezvoltarea pe un mediu în care este inclus un singur carbohidrat demonstrează utilizarea acestuia ca unică sursă de carbon. În mod asemănător se poate testa capacitatea asimilării unor substanţe azotate. *C. albicans* asimilează glucoză, maltoză, trehaloză, galactoză etc (vezi şi capitolul 12).
  - Zimograma: Testarea fermentării unor carbohidraţi
  - Utilizarea unor teste produse comercial precum API 20C, API 32C, Vitek etc
  - Relativ recent au fost puse la punct medii cromogene (ex. CHROMagar) care testează producerea anumitor enzime şi sunt utile în identificarea *C. albicans*, *C. krusei* şi *C. tropicalis*.
- Caractere antigenice:
  - Se pot utiliza reacţia de aglutinare pe lamă, reacţia de latex-aglutinare sau ELISA folosind antiseruri cunoscute. Ultimele două tehnici sunt folosite şi în scopul identificării prezenţei Ag de *Candida spp.* în diferite p.p.

BCU IAŞI - FACULTATEA DE MEDICINĂ UMF "GR. T. POPA" IAŞI LIBRARY

- Caractere de patogenitate:
  - Pornind de la o cultură de 24 de ore în mediul Sabouraud lichid separăm sedimentul şi realizăm o suspensie 0,2% a acestuia în soluţie salină fiziologică sterilă; inoculăm în venele cozii la un lot de şoareci (câte 0,2-0,8 ml pentru fiecare animal) suspensia obţinută şi urmărim evoluţia animalelor timp de 4-10 zile; dacă este vorba de o tulpină de *C. albicans* patogenă, animalele vor muri după circa 1 săptămână (anatomopatologic vom putea evidenţia abcese miliare renale, splenice, hepatice) etc.
- Alte teste ce pot fi studiate în scopul identificării germenilor:
  - Testul filamentării **(testul producerii de tubi germinativi):** Verificăm capacitatea blastoconidiilor de a produce, în anumite condiţii, tubi germinativi. Repicăm tulpina de studiat pe medii care conţin ser de iepure sau de berbec. La intervale de 60 de minute realizăm preparate proaspete (între lamă şi lamelă), examinăm microscopic pentru a identifica apariţia tubilor germinativi. *C. albicans* produce în maxim 4 ore pseudofilamente (tubi germinativi) relativ scurte, fără stricturi, cu acelaşi calibru.
  - Detectarea unor metaboliţi prin gaz-lichid cromatografie (GLC)
  - Teste de biologie moleculară (sonde nucleotidice, PCR).

5. Antifungigrama (verificarea sensibilităţii la antibiotice şi chimioterapice în vederea stabilirii tratamentului) a fost pusă la punct relativ recent. Eforturile depuse în vederea standardizării acestei tehnici au avut la bază creşterea interesului faţă de infecţiile fungice precum şi apariţia fenomenului de rezistenţă la medicamentele antifungice a tulpinilor izolate. Metoda recomandată de NCCLS este cea a diluţiilor în bulion.

Diagnosticul imunologic poate fi serologic şi imunobiologic.

Diagnosticul serologic

Cu toate că o serie de autori consideră drept nerelevant acest tip de diagnostic, diferite studii arată că identificarea şi titrarea Ac anti-*C. albicans* poate fi utilă în diagnosticul candidozelor profunde. Iniţial au fost utilizate tehnici de aglutinare pentru detectarea prezenţei Ac anti-manan. Ulterior au fost puse la punct tehnici pentru detectarea prezenţei Ac faţă de Ag localizate în citoplasma *C. albicans*. Au fost utilizate imunodifuzia în gel, contraimunoelectroforeza, ELISA şi tehnica de latex-aglutinare.

Diagnosticul imunobiologic

Intradermoreacţia cu candidină este pozitivă la practic toate persoanele adulte, fiind astfel utilă nu în diagnosticarea unei infecţii cu *Candida* ci în aprecierea RIC. Se mai poate utiliza testul transformării blastice a limfocitelor în prezenţa unor Ag de *C. albicans*.

Trebuie să menţionăm că există o serie de probleme privind standardizarea şi interpretarea tehnicilor diagnosticului imunologic. Cu toate că prin aceste modalităţi utilizate izolat nu putem pune diagnosticul de candidoză, interpretarea ansamblului rezultatelor de laborator obţinute poate fi de folos în elucidarea implicării patogenice a tulpinilor de *Candida albicans*.

52 DIAGNOSTICUL DE LABORATOR MICROBIOLOGIC ÎN INFECȚIILE ACUTE ALE CĂILOR RESPIRATORII INFERIOARE

În acest capitol al manualului vom prezenta modalitatea de abordare a infecţiilor acute ale căilor respiratorii inferioare din punctul de vedere al etiologiei bacteriene sau fungice. Acest capitol încearcă să realizeze o sinteză a tuturor elementelor prezentate până acum.

Infecţiile acute ale căilor respiratorii inferioare (IACRI) reunesc diferite entităţi precum traheite, bronşite, traheobronşite, exacerbări infecţioase acute ale unor bronşite cronice, bronşiolite, alveolite, pneumonii interstiţiale, bronhopneumonii etc. Primare sau secundare, IACRI sunt cel mai frecvent determinate pe cale aerogenă.

Flora microbiană normală

Infecţiile acute ale căilor respiratorii inferioare pot fi cauzate de foarte multe microorganisme diferite. Pentru elucidarea diagnosticului este necesar să avem în vedere câteva date privind flora bacteriană normală de la acest nivel. Spre exemplu, supraglotic (gingival, lingual, amigdalian, faringian etc) flora bacteriană poate include foarte numeroase specii, mai ales anaerobe, precum *Veillonella spp., Bacteroides melaninogenicus,* peptostreptococi dar şi streptococi *viridans, Neisseria spp., Staphylococcus epidermidis, Haemophilus spp.,* bacili difteromorfi, *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Candida albicans, Actinomyces spp., Fusobacterium spp.,* bacili gram-negativi etc. Cu toate că este frecvent supus contaminării microbiene, etajul infraglotic rămâne de regulă necolonizat.

În funcţie de agentul etiologic presupus sau identificat, uneori se impune instituirea terapiei antimicrobiene. Anumite circumstanţe clinice (semne, simptome, vârsta pacientului, existenţa unor boli subiacente), paraclinice (hemoleucograma, VSH, examenul radiologic etc) şi epidemiologice pot orienta diagnosticul şi relativ frecvent conduc la stabilirea unui tratament. Cu toate acestea dorim să subliniem pe de o parte că terapia antimicrobiană orientată numai pe baza acestor criterii nu are cum să acopere întregul spectru etiologic al IACRI, iar pe de altă parte nu trebuie uitat faptul că microorganismele implicate pot dobândi prin mecanisme variate rezistenţă la medicamentele antimicrobiene. Terapia antimicrobiană (în special atunci când sunt utilizate antibiotice cu spectru larg) poate conduce la apariţia unor dismicrobisme şi respectiv la multiplicarea în exces a unor microorganisme de tipul *Staphylococcus aureus,* bacililor coliformi, *Pseudomonas spp.* sau *C. albicans.*

În acest context diagnosticul etiologic (complet) al IACRI se menţine strict necesar, iar principiile care stau la baza lui trebuie cunoscute nu numai de către medicii microbiologi dar şi de către medicii clinicieni, **colaborarea** la toate nivelurile fiind esenţială.

Spectrul etiologic al IACRI

Pe baza datelor clinice şi epidemiologice şi având în vedere studiile realizate până în prezent, se cunoaşte lista microorganismelor mai frecvent implicate în etiologia IACRI, la diferite nivele.

- În bronşitele acute este de menţionat că mai frecvent infecţia este cauzată de virusuri, în ordinea frecvenţei fiind rhinovirusurile, coronavirusurile, virusul sinciţial respirator dar şi virusurile gripale şi paragripale, adenovirusurile, virusurile Coxsakie (de ex. A21) sau chiar virusul rujeolos. Dintre bacteriile implicate ar fi de amintit în special *Bordetella pertussis, Mycoplasma pneumoniae* şi *Chlamydia pneumoniae* în timp ce rolul etiologic al *Streptococcus pneumoniae* sau al *Haemophilus influenzae* rămâne mai dificil de evaluat.
- În literatura de specialitate este notat că în exacerbarea de cauză infecţioasă a unor bronşite cronice mai frecvent se regăsesc agenţi etiologici bacterieni precum *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis, Chlamydia pneumoniae* şi mai puţin frecvent *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus* sau diferiţi bacili gram negativi. Implicarea virală este destul de frecventă (virusurile gripale şi paragripale, virusul sinciţial respirator, rhinovirusurile, coronavirusurile) în special în sezoanele reci.
- Deşi se considera că bronşiolitele sunt determinate în special de bacterii, principalele microorganisme infecţioase sunt virusurile, cel mai frecvent virusul sinciţial respirator dar şi virusurile paragripale, rhinovirusurile, adenovirusurile, virusurile gripale, enterovirusurile iar dintre bacterii, *Mycoplasma pneumoniae.*
- Se estimează că diagnosticul etiologic este realizat în circa 50% dintre pneumonii.
  - Mai frecvent, dintre bacterii putem identifica: *Streptococcus pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Legionella spp., Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae,* bacterii anaerobe, în pneumonii de aspiraţie *(Bacteroides spp., Fusobacterium spp., Peptostreptococcus spp., Peptococcus spp.),* enterobacterii *(Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Enterobacter spp., Serratia spp.)* sau *Pseudomonas aeruginosa;*
  - Mai puţin frecvent, dintre bacterii putem identifica: *Acinetobacter* var. *anitratus, Streptococcus pyogenes, Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis,* mycobacterii non-tuberculoase, *Actinomyces* şi *Arachnia spp., Bordetella pertussis, Coxiella burnetii, Bacillus spp.* (ex. *B. anthracis), Eikenella corrodens, Neisseria meningitidis, Nocardia spp., Pasteurella multocida, Rickettsia rickettsiae, Proteus spp., Salmonella spp., Brucella spp., Pseudomonas pseudomallei, Yersinia pestis, Leptospira spp.,* etc;
  - Dintre fungi, ar putea fi identificaţi: *Aspergillus spp., Candida spp., Coccidioides immitis, Pneumocystis jiroveci, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Rhizopus spp., Mucor spp., Blastomyces dermatidis* etc;
  - Dintre paraziţi, ar putea fi identificaţi: *Ascaris lumbricoides, Strongyloides stercoralis, Toxocara cati* şi *Tocara canis, Ancylostoma duodenalis, Necator americanus, Schistosoma spp., Toxoplasma gondii, Entameoba hystolitica, Paragonimus westermani* etc;
  - Următoarele virusuri sunt mai frecvent întâlnite în etiologia pneumoniilor la copii: virusul sinciţial respirator, virusurile paragripale (tip 1, 2, 3), virusul gripal tip A; mai puţin frecvent ar putea fi implicate: adenovirusurile (tip 1, 2, 3, 5), virusul gripal tip B, rhinovirusurile, virusurile Coxsakie, echovirusurile, virusul rujeolos, hantavirusul etc;

- Următoarele virusuri sunt mai frecvent întâlnite în etiologia pneumoniilor la adulţi: virusule gripale tip A şi B, adenovirusurile (tip 4, 7); mai puţin frecvent ar putea fi implicate: rhinovirusurile, adenovirusurile (tip 1, 2, 3, 5), enterovirusurile, virusul Epstein-Barr, virusul citomegalic, virusul sinciţial respirator, virusul paragripal, virusul rujeolos, hantavirusul etc.

Etiologia IACRI poate suferi modificări importante în funcţie de o serie de factori care ţin de vârstă, capacitatea de apărare faţă de infecţii, locul transmiterii agentului etiologic (în comunitate sau nozocomial), zona geografică etc.

Diagnosticul de laborator microbiologic

Diagnosticul de laborator în microbiologie poate fi un diagnostic direct (bacteriologic, parazitologic, micologic, virusologic), un diagnostic indirect (imunologic) sau o combinaţie a celor două variante menţionate.

A. Diagnosticul de laborator direct are mai multe etape într-o succesiune logică, cu pondere variată în funcţie de microorganismul studiat. În mod clasic, în special pentru bacterii şi fungi sunt menţionate 5 etape distincte, fiecare dintre etape având o anumită importanţă, uneori decisivă, în stabilirea cu precizie a speciei implicate precum şi pentru identificarea celui mai potrivit tratament antimicrobian. Indiferent de clasa din care fac parte microorganismele responsabile pentru o anumită infecţie, primele etape sunt esenţiale şi reprezintă o condiţie a diagnosticului etiologic. În funcţie de datele care îi sunt furnizate de colegul clinician, în funcţie de experienţa teoretică şi practică acumulată, medicul de laborator poate insista pe anumite etape şi eventual poate trece mai uşor peste altele ajungând totuşi la un rezultat corespunzător. Mai mult decât atât, este uşor de înţeles că profunzimea diagnosticului de laborator va fi diferită şi între laboratoare diferite, putându-se discuta în acest sens de nivelul de competenţă al laboratorului. Spre exemplu la nivelul unui laborator organizat de către un grup de medici de familie în cadrul unui centru al medicilor de familie se vor putea realiza în special etapele de recoltare, transport iniţial şi examinarea microscopică a produselor patologice recoltate de la bolnavi cu presupuse maladii infecţioase, iar cultivarea, identificarea şi respectiv testarea sensibilităţii la agenţii antimicrobieni se va putea finaliza la un laborator de un nivel superior, de ex. la nivelul unei clinici sau la nivelul unui spital. Un spital de profil poate continua identificarea până la un nivel de subtilitate superior însă testarea din majoritatea punctelor de vedere se va realiza la nivelul unui centru de referinţă (care va avea şi responsabilitatea organizării **controlului extern** de calitate – **controlul intern** intrând în atribuţiile fiecărui laborator, pentru analizele care intră în competenţa sa).

1. **Recoltarea şi transportul produsului biologic/patologic** (cât mai aproape de debutul bolii, înainte ca pacientul să fi luat antibiotice, cât mai rapid şi corect din punct de vedere al tehnicilor utilizate, respectând toate normele de asepsie şi antisepsie şi prelevând un anumit produs patologic în funcţie de manifestarea clinică în cazul respectiv, de exemplu spută în cazul unei infecţii localizate la nivel pulmonar etc), reprezintă o etapă esenţială. Pentru diagnosticul microbiologic al IACRI se pot examina:

- prelevate care se pot contamina în cursul recoltării cu flora bacteriană normală: spută, exsudat nazal, sau faringian recoltat cu un tampon special steril, aspirat nazal sau faringian, aspirat hipofaringian, produs recoltat prin bronhoscopie simplă etc şi/sau

- prelevate pentru care se evită contaminarea orofaringiană: aspirat transtraheal, aspirat transtoracic, aspirat bronhoscopic prin cateter protejat cu canule telescopate/lavaj bronhoalveolar, biopsie transbronşică, biopsie pulmonară pe torace deschis, aspirat pleural, sânge.

În cazul în care este posibilă contaminarea orofaringiană apar o serie de probleme de interpretare şi (în contextul clinic, paraclinic şi de laborator) trebuie făcut efortul de a stabili dacă microorganismele izolate au sau nu **semnificaţie clinică.** Este de asemenea util de stabilit dacă după decelarea acestora prin microscopie este sau nu indicată cultivarea, identificarea şi testarea sensibilităţii la antibiotice. Pe de altă parte trebuie avut în vedere că, un microorganism implicat patogenic în maladia aflată în investigaţie poate fi pretenţios din punctul de vedere al necesităţilor nutritive, al sensibilităţii faţă de acţiunea factorilor de mediu (ex. *Bordetella pertussis),* se poate multiplica într-un interval de timp mai lung sau poate fi „mascat" prin dezvoltarea simultană a unor microbi de contaminare etc.

Conform cunoştinţelor actuale, se poate menţiona că unele microorganisme au semnificaţie clinică indiferent de produsul patologic în care sunt depistate, spre exemplu majoritatea virusurilor, *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia spp., Coxiella burnetii, Legionella pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatiditis, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, Entamoeba hystolitica.*

În IACRI este recomandat să se recolteze sânge (pentru hemocultură), lavaj bronhoalveolar sau aspirat transtraheal. Recoltarea a 3 hemoculturi în 24 de ore sau cel puţin 2 recoltări din 2 vene diferite permit izolarea unui procent important de microorganisme în faza de pneumonie însoţită de bacteriemie sau fungemie.

Cu toate că este contaminată cu flora normală orofaringiană, sputa continuă să reprezinte produsul patologic cel mai frecvent recoltat, în majoritatea IACRI. Se pot obţine probe calitativ corespunzătoare în momentul în care pacientul se prezintă în unitatea sanitară (este recomandabil să se recolteze prima spută eliminată matinal şi în nici un caz sputa din 24 de ore), însă este necesar ca pacienţii să fie cooperanţi. Pacientul trebuie să înţeleagă diferenţa dintre „a expectora" şi „a tuşi şi scuipa". Înaintea prelevării se recomandă periajul simplu al dinţilor, clătirea energică a gurii şi gargara cu apă (sau cu soluţie salină fiziologică). Dacă proba apare constituită în principal din salivă, se insistă imediat pentru prelevarea unei noi probe care să permită ulterior definitivarea diagnosticului. În IACRI o probă mucopurulentă în volum de 2-3 ml ar putea fi suficientă. Stimularea expectoraţiei prin inhalarea de aerosoli calzi cu soluţie salină (3%) oferă, de cele mai multe ori, probe citologic nesatisfăcătoare (sputa indusă ar putea fi însă utilă în diagnosticarea unei infecţii cu *Pneumocystis jiroveci).* În cazul în care se presupune o infecţie mycobacteriană sau fungică este recomandată recoltarea şi prelucrarea a 3 produse, în 3 zile consecutive.

Raportul dintre produsul patologic (obiectivat prin numărul celulelor inflamatorii şi prezenţa fibrinei) şi contaminarea orofaringiană (numărul celulelor epiteliale scuamoase), permite stabilirea unui prag de calitate acceptată a probelor, precum şi condiţiile în care se refuză prelucrarea produsului patologic. Refuzarea prelucrării unui produs nu trebuie să fie înţeleasă ca o diminuare a autorităţii celui care a solicitat analiza ci drept o simplă solicitare pentru un produs patologic care să permită obţinerea informaţiilor utile în îngrijirea pacientului respectiv.

Examinarea macroscopică a produsului recoltat poate aduce uneori informaţii utile. Se observă consistenţa, cantitatea, aspectul, culoarea; sputa poate fi vâscoasă, purulentă de culoare galben-verzuie, culoarea se poate modifica spre cenuşiu sau brun deschis, poate prezenta striuri de sânge sau poate avea o culoare ruginie etc.

Spălarea sputei intens mucopurulente (în 3 băi succesive de soluţie salină izotonă) reduce contaminarea orofaringiană fără a influenţa semnificativ concentraţia bacteriei infectante prinsă în trama fibrinoasă a probei. Este recomandată în vederea sputoculturii. Fluidifierea (de ex. cu N-acetil-L-cisteină) permite omogenizarea produselor patologice; se realizează în câteva minute.

În cazul suspicionării unei infecţii fungice, probele fluide se concentrează prin centrifugare 20 de minute la 3.000 rotaţii/minut, apoi se examinează sedimentul. Din probele bioptice se disecă mici fragmente suspecte cu dimensiunea de circa 1 mm care sunt apoi examinate la stereomicroscop cu mărire 30×. Ţesutul cazeos, fibros şi grăsimea ascund în mod frecvent hifele, iar tratarea cu KOH nu clarifică preparatul fiind necesară disocierea şi omogenizarea probei. Majoritatea autorilor recomandă digestia pepsică a probelor fibrocazeoase.

Produsele patologice recoltate pentru diagnosticul microbiologic **trebuie transmise prompt către laborator** (preferabil în maxim 1 oră, acceptabil în 1-2 ore). Toţi cei implicaţi trebuie să realizeze faptul că microorganismele sunt vii, se multiplică sau pot să fie distruse rapid în timpul recoltării, transportului sau stocării astfel încât semnificaţia clinică se poate pierde. Produsele recoltate într-un recoltor steril de 50-200 ml, cu capac care permite o închidere etanşă, sunt etichetate şi expediate imediat la laborator pentru a fi examinate. Nu există modalităţi optime de conservare a probelor. Menţinerea la o temperatură de 4°C previne multiplicarea contaminanţilor, conservă unii patogeni, dar scade până la anulare şansa de izolarea a altora (ex. *H. influenzae*). Utilizarea unui mediu de transport perturbă raportul dintre bacterii şi reperele citologice ale probei, esenţiale pentru apreciere calităţii probei şi interpretarea rezultatelor sputoculturii, dar în cazul în care se apreciază că se va depăşi timpul de transport recomandat se poate utiliza mediul Stuart sau Amies. Spre exemplu, în cazul în care se urmăreşte izolarea *M. pneumoniae*, cultivarea trebuie făcută cât mai rapid; produsul patologic poate fi conservat maxim 4 ore în lipsa unui mediu special şi până la maxim 24 de ore dacă se utilizează mediul de transport pentru micoplasme. În cazul în care ar fi necesară o conservare prelungită, este necesară utilizarea unei temperaturi de –70°C (în nici un caz temperatura congelatorului obişnuit).

Subliniem încă o dată **importanţa critică a primei etape a diagnosticului direct**, etapă care este valabilă indiferent de tipul microorganismului care urmează a fi investigat. Produsele patologice trebuie recoltate de la locul şi în momentul potrivit, în containere sterile, evitând orice contaminare microbiană. Containerele trebuie să fie închise ermetic pe tot timpul transportului, asigurându-se evitarea oricărui incident care ar putea conduce la contaminarea mediului înconjurător dar şi menţinerea condiţiilor fizice şi chimice care sunt necesare pentru supravieţuirea microorganismelor care urmează a fi izolate şi identificate; containerele vor fi marcate în mod vizibil pentru a se şti exact ce produs urmează a fi transportat. Nu este eronată afirmaţia că, se poate pierde mult timp şi că o serie de erori (evitabile) se datorează etichetării incomplete sau eronate a recipientelor cu produse patologice recoltate în scop diagnostic. Marcajul trebuie să fie rezistent la condiţiile exterioare (umezeală, îngheţ, temperatură ridicată etc).

Atât la nivelul clinicii sau instituţiei sanitare unde are loc recoltarea cât şi la nivelul laboratorului unde urmează a fi primit produsul patologic, personalul trebuie să fie instruit în privinţa recoltării şi manipulării acestor produse, pentru respectarea cu stricteţe a precauţiunilor universale şi minimalizarea oricărui risc profesional. Aşa cum este necesară o marcare corespunzătoare a produselor înainte de a fi trimise către laborator, la nivelul laboratorului, recepţia acestor produse implică transcrierea unui număr, a unor alte date sumare în registrul de lucru (eventual – de preferat – în sistem computerizat); eventualele erori apărute în această subetapă pot avea consecinţe grave, afectând performanţele laboratorului datorită unor cauze până la urmă uşor de prevenit.

Produsul patologic recoltat şi inclus în containerul de transport trebuie să fie însoţit de un buletin de trimitere care să conţină câteva informaţii privind identitatea bolnavului (eventual numele va putea fi înlocuit cu un cod), date clinice sumare şi o supoziţie de diagnostic, data debutului şi respectiv data şi ora la care a avut loc prelevarea, produsul prelevat, dacă au fost utilizate tehnici speciale pentru recoltarea produsului patologic, numele şi adresa (instituţională) persoanei care trimite produsul de analizat etc.

2. **Examinarea microscopică a produsului patologic** reprezintă de multe ori o **altă etapă esenţială,** care poate orienta paşii următori. Examenul microscopic se poate realiza rapid, costul examinării este mult mai redus decât costul altor analize microbiologice însă trebuie să nu uităm că există anumite probleme legate de sensibilitate, specificitate, subiectivismul uman, dificultatea sau imposibilitatea diagnosticului de specie, imposibilitatea aprecierii dacă microorganismele identificate sunt sau nu viabile etc. Cu toate acestea examenul microscopic este indispensabil şi uneori numai pe baza acestuia pot fi luate anumite decizii importante pentru pacientul investigat. Există anumite particularităţi în funcţie de agentul etiologic probabil.

Microscopia de rutină realizată pornind de la produse patologice omogenizate este formal contraindicată pentru că omogenizarea perturbă raportul dintre celule şi microorganisme. Studierea acestui raport este necesară în vederea aprecierii corecte a calităţii probelor şi stabilirii semnificaţiei microorganismelor observate şi izolate. În plus, omogenizarea conduce la amestecarea celulele inflamatorii cu celulele epiteliale scuamoase şi distruge insulele de celule inflamatorii. Etalarea pe frotiu a produselor neomogenizate nu reprezintă o situaţie ideală. Pentru a obţine un maxim de informaţie, preparatul microscopic trebuie vizualizat întâi cu un obiectiv mic pentru o apreciere globală în ceea ce priveşte distribuţia elementelor (celule, fibrină, mucus etc) şi ulterior cu un obiectiv mai puternic pentru observarea detaliilor din zonele suspectate.

În vederea unui triaj citologic de calitate, frotiul din spută este examinat cu obiectivul uscat (ex. 40×). Pe câmpurile în care celulele sunt dispuse în monostrat, se numără celulele inflamatorii şi respectiv celulele epiteliale scuamoase; rezultatul se include într-o gupă de calitate, aşa cum este prezentat în tabelul următor (Murray, Washington, Buiuc). Cu toate că nu există o unanimitate a părerilor în privinţa acestei clasificări, considerăm că ar trebui acceptate pentru examinare numai probele care se încadrează în grupele 3-5 de calitate. În infecţiile produse de mycobacterii, fungi şi virusuri aspectul poate fi diferit şi nu se aplică cuantificarea menţionată mai sus.

Triajul citologic de calitate pentru frotiurile din spută

Grupa	Celule epiteliale	Celule inflamatorii
1	>25	<10
2	>25	10-25
3	>25	>25
4	10-25	>25
5	<10	>25
6	<25	<25

Se poate acorda semnificaţie clinică bacteriilor condiţionat patogene care sunt vizualizate microscopic şi apoi izolate predominant, care se regăsesc asociate în mod semnificativ celulelor inflamatorii pe frotiul din spută şi eventual sunt fagocitate. În condiţiile în care se realizează frotiuri din produse care nu sunt contaminate cu flora bacteriană de asociaţie, prezenţa microorganismelor este semnificativă ca atare.

2.1. În cazul suspicionării unei **infecţii bacteriene** se poate utiliza examinarea preparatului proaspăt, între lamă şi lamelă dar se vor realiza şi minim două frotiuri din produsul patologic recoltat şi transportat corespunzător, care se vor colora cu albastru de metilen (AM) şi respectiv prin coloraţia Gram. Anumiţi autori preferă în locul colorării cu AM coloraţia Giemsa considerând că aceasta permite studierea unor detalii citologice utile. Este de recomandat să avem întotdeauna cel puţin un frotiu de rezervă, mai ales în cazul în care produsul patologic este „preţios", a fost recoltat printr-o manevră invazivă etc (ex. produs recoltat prin puncţie-biopsie, lavaj bronho-alveolar etc). În cazul suspicionării unei infecţii mycobacteriene este necesară realizarea a cel puţin trei frotiuri; frotiul suplimentar se va colora Ziehl-Neelsen. Frotiurile se examinează la microscopul optic iniţial cu obiectivul 40× şi după alegerea câmpurilor care urmează să fie investigate mai amănunţit, cu obiectivul de imersie 90× sau 100×. Se notează prezenţa diferitelor celule de exfoliere a epiteliului respirator (eventual modificate faţă de normal), prezenţa celulelor inflamatorii (de exemplu polimorfonucleare neutrofile, macrofage şi histiocite, monocite, eozinofile, limfocite, plasmocite), precum şi eventuala prezenţă a microbilor (dispuşi extra şi/sau intra celular), care va fi interpretată cu precauţie. Aspectul microscopic al diferitelor microorganisme a fost prezentat în capitolele anterioare.

Utilizând alte tehnici de „colorare" (ex. cu anticorpi marcaţi fluorescent) şi/sau diferite tehnici bazate pe reacţii antigen-anticorp (coaglutinare, aglutinare, latex aglutinare) se poate încerca un diagnostic prezumtiv pornind de la produsul patologic; specificitatea şi sensibilitatea acestor reacţii sunt însă relativ scăzute.

2.2. În cazul suspicionării unei **infecţii fungice,** spre exemplu dacă se presupune prezenţa *Pneumocystis jiroveci,* din sedimentul rezultat în urma prelucrării sputei se realizează frotiuri care se pot colora Giemsa şi/sau cu albastru de toluidină. Examinarea frotiului colorat cu albastru de toluidină se face folosind obiectivul cu imersie; lamele se examinează integral sau până se identifică un chist de *P. jiroveci* (ovalar sau rotund, conţine un număr par de sporozoizi, colorat în violet sau purpuriu spre deosebire de elementele celulare care

se colorează în albastru deschis; peretele chistului nu se colorează, în jurul sporozoizilor rămâne un halou). Pentru punerea în evidenţă a trofozoiţilor se utilizează coloraţia Giemsa (citoplasma trofozoitului apare albastru pal iar nucleul roşu). Prelevatul obţinut în urma unei biopsii pe plămân deschis poate servi la realizarea unui preparat microscopic care se poate colora cu calcofluor şi permite evidenţierea formei chistice. Dacă biopsia pe plămân deschis este contraindicată, biopsia transbronşică este rapidă, sigură şi cu puţine complicaţii. Preparatele microscopice se pot colora utilizând anticorpi monoclonali marcaţi fluorescent în cadrul tehnicii de imunofluorescenţă.

Examenul micologic începe de regulă cu microscopia directă care permite stabilirea unui diagnostic prezumtiv rapid şi iniţierea terapiei înainte de izolarea şi identificarea definitivă a fungului precum şi selectarea mediilor de cultură adecvate în vederea izolării, identificării şi testării sensibilităţii la medicamentele antifungice. În mod uzual se examinează preparatul proaspăt, montat în soluţie 20% de KOH-glicerol.

Trebuie efectuate coloraţia Gram şi o coloraţie pentru microorganisme acido-rezistente atunci când suspiciunea de micoză nu exclude nocardioza sau tuberculoza. Spre exemplu *Candida albicans* apare sub formă de levuri ovale, înmugurite, gram pozitive; se pot observa şi pseudofilamente. Uneori pe frotiurile colorate Gram elementele fungice sunt deformate prin fixarea precipitatelor de cristal violet.

Coloraţiile negative cu tuş de India sau, mai bine, cu nigrozină sunt indicate pentru a depista *Cryptococcus neoformans* capsulat (în sedimentul LCR sau în alte prelevate) precum şi *Aspergillus spp.* în produsul rezultat prin digestia pepsică a probelor bioptice. Pe fondul negru al preparatului, în jurul levurilor se observă capsula polizaharidică necolorată; hifele zigomicetelor apar de asemenea necolorate. Sensibilitatea depistării *C. neoformans* prin coloraţie negativă este relativ modestă; rezultatele pot fi îmbunătăţite utilizând latex aglutinarea. Predigestia probelor cu pronază sau tratarea la cald cu EDTA ameliorează specificitatea reacţiei reducând semnificativ rezultatele fals pozitive.

Coloraţia Giemsa este indicată pentru depistarea formelor levurice intramacrofagice de *Histoplasma capsulatum,* celule ovale de 2-4 μm, înmugurite la extremitatea ascuţită. *B. dermatidis* apare liber sau intramacrofagic sub formă de levuri rotunde cu diametrul de 8-15 μm, cu perete gros refractil şi un singur blastospor cu baza largă de implantare.

Examenul secţiunilor tisulare colorate cu hematoxilin-eozină, dar mai ales cu nitrat de argint methenamină prin metoda Gömori oferă detalii morfologice mai fine ale fungilor.

3. **Cultivarea pe medii de cultură a produsului patologic** se va face în funcţie de situaţie (mediile şi condiţiile de incubare se vor alege în funcţie de presupusul microorganism pe care dorim să-l izolăm), în special în cazul infecţiilor bacteriene sau fungice.

3.1. În cazul suspicionării unei infecţii bacteriene cultivarea se va realiza în aşa fel încât să se poată obţine colonii izolate şi ulterior o **cultură pură,** care se va identifica. Tehnica de însămânţare „în dispersie" este şi la îndemâna medicilor clinicieni (pneumologi, infecţionişti etc) care în cazuri limită ar putea procesa personal p.p. în vederea unui diagnostic direct. Agarul sânge, un mediu indispensabil, permite izolarea majorităţii bacteriilor implicate în etiologia IACRI acute.

Pentru izolarea *S. pneumoniae* se va utiliza geloza-sânge şi o atmosferă de 5% CO_2; *H. influenzae* necesită un mediu de tipul geloză-chocolat, prezenţa factorilor de creştere (X, V) şi

o atmosferă de 5-10% CO_2; *Legionella pneumophila* se dezvoltă pe mediul special BCYEα la care se adaugă polimixină sau vancomicină, în circa 5 zile, într-o atmosferă de 2-5% CO_2, iar pentru dezvoltarea *M. pneumoniae* se poate utiliza un mediu pe bază de infuzie de cord bovin suplimentat cu extract proaspăt de drojdie de bere, ser normal de cal şi glucoză, în atmosferă de 5% CO_2, în plăci etanşeizate (pentru a se preveni uscarea) incubate mai mult de 1 săptămână etc. *Chlamydia pneumoniae* se poate dezvolta numai pe culturi de celule (ex. pe linia celulară Hep-2).

3.2. În cazul infecţiilor fungice, spre exemplu în cazul unei infecţii produse de *P. jiroveci*, se poate realiza o cultivare a lichidului de lavaj bronhoalveolar sau a unor fragmente de ţesut pulmonar obţinut bioptic sau la necropsie. Cultivarea este relativ complicată în sensul că este necesară aplicarea unor tehnici care separă după centrifugare mai multe straturi (4); trofozoiţii se pot găsi în straturile 1 şi 2 în timp ce în straturile 3 şi 4 predomină chiştii, iar celelalte straturi conţin fragmente de ţesut. Materialul colectat din straturile 1-4 resuspendat într-un mediu special constituie inoculul. Acest fung nu se dezvoltă pe medii obişnuite ci de ex. pe culturi primare de celule alveolare pulmonare, la 37°C şi 5% CO_2. Examinarea culturilor se face cu ajutorul microscopului inversat, după circa 4 zile de cultivare.

Pentru izolarea corectă a fungilor patogeni sau oportunişti trebuie să reţinem faptul că majoritatea fungilor cultivă lent, aerob; bacteriile contaminante cu ritm de multiplicare mai rapid decât cel al fungilor pot invada şi degrada mediul înaintea dezvoltării coloniilor fungice; mediul de cultură poate fi invadat de fungii saprofiţi (de contaminare). Temperatura optimă pentru cultivarea fungilor este de 30°C, însă cultivarea este posibilă şi la temperatura camerei; speciile implicate patogenic se pot multiplica şi la 37°C, temperatură la care fungii dimorfi cultivă în forma lor levurică.

Mediul de cultură cel mai la îndemâna laboratoarelor din ţara noastră, este mediul Sabouraud glucozat; aceste mediu permite izolarea celor mai mulţi fungi implicaţi în infecţiile diagnosticate. În anumite cazuri, spre exemplu pentru fungii pretenţioşi precum *H. capsulatum* este necesară utilizarea unor medii speciale, de ex. agar-infuzie de cord-creier îmbogăţit cu 5% sânge de berbec. Pe de altă parte, prezenţa sângelui în mediul de cultură poate inhiba dezvoltarea unor tulpini de *Blastomyces dermatitidis*, nu însă şi de *Coccidioides immitis* sau *Cryptococcus neoformans*.

Mediile selective inhibă dezvoltarea bacteriilor prin includerea de cloramfenicol şi/sau gentamicină; în vederea inhibării multiplicării fungilor saprofiţi în mediul de cultură se poate include cycloheximidă. Este de reţinut că în concentraţii mari, cloramfenicolul şi gentamicina inhibă şi dezvoltarea unor tulpini de *H. capsulatum;* din acest motiv prelevatele care sunt recoltate în condiţii care ne permit să presupunem că nu sunt contaminate se recomandă a fi cultivate pe medii fără antibiotice. În plus, cycloheximida poate inhiba diferiţi fungi precum *Aspergillus spp., Mucor spp.* sau *Cryptococcus neoformans*. Atunci când se ridică suspiciunea unor infecţii cu aceste microorganisme, mediile nu trebuie să conţină cycloheximidă.

Laboratoarele care nu dispun de termostat separat, reglat la 30°C, pot incuba culturile la temperatura camerei. Izolarea fungilor dimorfi pe set dublu de medii incubate la 37°C pentru forma levurică şi la 30°C pentru forma filamentoasă este situaţia ideală. Totuşi, incubarea poate fi făcută numai la 22-30°C şi doar în caz de creştere sugestivă se tentează inducerea formei levurice din forma filamentoasă prin incubarea subculturii la 37°C.

Deoarece mulţi fungi implicaţi patogenic au ritm de multiplicare lent, culturile trebuie incubate în incintă cu umiditate de 50-70%. Un rezultat negativ poate fi comunicat definitiv numai după circa 6 săptămâni de urmărire a culturilor; levurile şi zigomicetele cresc în interval de 3-5 zile, fungii monomorfi septaţi (ex. *Aspergillus spp.)* se dezvoltă între 3-7 zile, iar cei dimorfi între 2 şi 45 zile.

Sporii şi conidiile fungice **expun** personalul de laborator la **infecţii aerogene,** iar mediile de cultură la contaminarea cu variate mucegaiuri. Din această cauză, manipularea pentru studiu a culturii fungilor filamentoşi se va face numai în boxă de siguranţă antiepidemică de clasă I (sau cel puţin în boxă sau hotă simplă; în această situaţie este necesară protecţia cu mască, contraindicarea lentilor de contact, dezinfecţia aerului şi suprafeţelor incintei după fiecare operare). Culturile de levuri pot fi procesate în aceleaşi condiţii impuse în cazul cultivării bacteriilor.

4. **Identificarea microorganismului implicat** în etiologia maladiei investigate se poate realiza având în vedere mai multe caractere fenotipice:

a) Caractere morfologice

a.1. În cazul suspicionării unei infecţii bacteriene se va face un frotiu din colonia izolată, frotiu care se va colora Gram sau Ziehl-Neelsen, după caz, şi se va examina microscopic. În această situaţie se vor evidenţia numai microorganisme care au aceeaşi formă şi tinctorialitate (o colonie bacteriană este o clonă), de ex. coci gram pozitivi lanceolaţi, eventual în diplo şi capsulaţi, bacili gram negativi pleomorfi etc.

a.2. *Candida albicans* formează pseudohife cu ciorchini de blastoconidii în dreptul septurilor; pseudohifele evoluează în hife; pot apărea chlamidospori terminali (formarea chlamidosporilor este inhibată la 30-37°C). Identificarea se face pe baza examenului microscopic realizat dintr-o cultură pe medii sărace din punct de vedere nutritiv, incubate la 25-28°C, încercând să evidenţiem prezenţa chlamidosporilor. De reţinut că 3-4% dintre tulpinile de *C. albicans* nu produc chlamidospori. Suplimentar se realizează testul filamentării, pe medii care conţin ser de iepure şi în care *C. albicans* produce în circa 4 ore pseudofilamente. În acest scop, la intervale de 60 de minute se realizează preparate proaspete între lamă şi lamelă care se examinează microscopic. Pentru *C. neoformans* se poate observa acelaşi aspect ca şi la examenul direct. În cazul *H. capsulatum* apar hife septate, ramificate, care formează macroconidii rotunde sau piriforme, cu diametrul 8-14 μm, dispuse pe laturile hifelor şi microconidii de 2-4 μm. Examinarea microscopică a coloniilor de *B. dermatidis* permite observarea unor hife ramificate purtătoare de conidii sferice sau ovale, cu diametrul de 2-4 μm, pe conidiofori laterali sau terminali. Hifele aeriene de *C. immitis* formează artrospori care alternează cu celule clare; fragmentarea hifelor eliberează artrosporii care sunt antrenaţi foarte uşor de curenţi de aer şi pot produce infecţii de laborator. *Aspergillus spp.* prezintă conidiofori de dimensiuni mari (300-850 μm), drepţi, neseptaţi, care se desprind în unghi drept fie direct din hifa vegetativă, fie dintr-o celulă hifală specializată numită celulă picior. Extremitatea distală a conidioforilor este umflată şi formează o veziculă pe care se formează şi aliniază fialide şi apoi conidii.

b) Caractere de cultură

b.1. În cazul suspicionării unei infecţii bacteriene se vor examina coloniile izolate apărute pe mediile de cultură solide şi care pot fi de tip S de exemplu pentru *Streptococcus pyogenes,* de tip R în cazul *Mycobacterium tuberculosis* şi respectiv de tip M în cazul bacteriilor capsu-

late, de exemplu *Klebsiella pneumoniae*. Prin examinarea culturilor bacteriene se pot identifica şi alte aspecte utile în identificare, spre exemplu tipul de hemoliză pe geloză sânge (α, α', β), apariţia unor pigmenţi (în cadrul speciilor de stafilococi, pentru diferenţierea *M. tuberculosis* de mycobacteriile netuberculoase etc), necesitatea unor factori de creştere (X, V pentru *Haemophilus influenzae*, respectiv fenomenul de satelitism). Coloniile de *L. pneumophila* sunt iniţial punctiforme şi pot fi observate numai la stereomicroscop; după 3-5 zile devin vizibile cu ochiul liber atingând un diametru de circa 1 mm. Cultura de *M. pneumoniae* trebuie verificată de 2 ori pe săptămână la stereomicroscop pentru a surprinde apariţia microcoloniilor muriforme, al căror diametru creşte progresiv de la circa 10 μm la 200-300 μm.

b.2. Coloniile de *Candida albicans* apar mai rapid decât coloniile altor levuri, sunt asemănătoare cu coloniile de tip S bacteriene (dar de dimensiuni mai mari), au culoare alb sau crem şi degajă o aromă caracteristică de drojdie. *C. neoformans* formează colonii mucoide de culoare iniţial albă sau crem, care devine progresiv maronie. Coloniile de *H. capsulatum* sunt pufoase. *B. dermatidis* formează colonii albe sau de culoare castanie, pufoase care cresc progresiv până la periferia plăcii. Coloniile *C. immitis* sunt albe şi pufoase care se extind şi în câteva zile acoperă suprafaţa mediului în timp ce *Aspergillus flavus* produce colonii plate, brăzdate sau zbârcite, galben verzui până la verde închis, acoperite cu miceliu aerian pufos.

c) Caractere biochimice

c.1. În cazul suspicionării unei infecţii bacteriene caracterele biochimice pot fi foarte destul de variate de la o specie de microorganisme la alta şi pot fi foarte utile spre exemplu în cazul diferenţierii enterobacteriilor (deşi acestea sunt relativ rar implicate în infecţii ale tractului respirator inferior). În schimb diferenţierea *Streptococcus pneumoniae* de *Streptococcus viridans* cu ajutorul testului bilolizei, pe baza fermentării inulinei sau a sensibilităţii la optochin (ambele specii producând hemoliză viridans pe geloză sânge) are importanţă practică. În cazul *H. influenzae*, pe lângă necesităţile nutritive deja menţionate putem menţiona că există o serie de caractere biochimice care pot permite identificarea, actualmente mult mai facil, datorită introducerii în practică a multitestelor de tip API. În cazul identificării *L. pneumophila* caracterele biochimice nu sunt foarte utile, în schimb pentru *M. pneumoniae* verificarea virajului pH-ului, fermentarea diferitelor substraturi şi hemadsorbţia (adsorbţia de hematii de cobai) pot fi utilizate cu rezultate bune.

c.2. Există o serie de caractere biochimice utile în identificarea levurilor; se pot realiza zimograma (test de fermentare a zaharurilor) şi auxanograma (aprecierea capacităţii de asimilare a anumitor zaharuri sau a anumitor substanţe azotate).

d) Caractere antigenice care vor fi examinate bazându-ne pe structura antigenică a microorganismelor precum şi pe specificitatea reacţiilor antigen-anticorp, utilizând **anticorpi cunoscuţi** pentru a identifica antigenele microbiene necunoscute.

d.1. Identificarea *S. pneumoniae* se poate realiza cu ajutorul reacţiei de umflare a capsulei, reacţiei de aglutinare pe lamă sau reacţiei de coaglutinare; reacţia de umflare a capsulei se poate aplica şi pentru *Klebsiella pneumoniae*. În mod clasic dintre tipurile capsulare de *H. influenzae* este de regulă identificat tipul b (aglutinare, coaglutinare, imunofluorescenţă). Pentru *L. pneumophila* utilizarea reacţiilor de aglutinare sau imunofluorescenţă reprezintă teste foarte utile în procesul identificării acestui microorganism.

d.2. La nivelul unor laboratoare de referinţă se poate realiza identificarea fungilor pe

baza structurii antigenice, utilizând anticorpi specifici cunoscuţi, prin diferite tehnici imunologice. Un exemplu este reprezentat de identificarea antigenului capsular al *C. neoformans* prin reacţii de latex-aglutinare (cu sau fără anticorpi monoclonali). În infecţiile levurice, antigenele (exoantigene) pot fi identificate prin reacţii de imunodifuzie (microimunodifuzie). Singurul test eficace de identificare a *H. capsulatum* se realizează prin tehnica RIA.

e) Caractere de patogenitate

e.1. În diagnosticul bacteriologic se va examina spre exemplu capacitatea unui microorganism de a elabora anumite substanţe cu rol în patogenitate (exemplu coagulaza produsă de *Staphilococcus aureus)* sau infecţia experimentală la animalul de laborator (de exemplu, izolarea pneumococilor din sputa unui pacient cu pneumonie prin inocularea sputei la şoarecele alb; în cazul în care în spută există pneumococi, animalul va muri în 24-48 de ore, iar din sângele lui se va izola o „cultură pură" de pneumococi).

e2. În genul *Cryptococcus,* singura specie care omoară după 4-5 zile şoriceii inoculaţi intracerebral sau intraperitoneal este *C. neoformans. Candida albicans* este virulentă pentru şoareci şi iepuri inoculaţi intravenos sau pentru embrionii de găină.

În afară de caracterele fenotipice menţionate mai sus, de la caz la caz (atât în funcţie de microorganismul studiat cât şi în funcţie de nivelul laboratorului care este implicat în analiză - diagnostic) se pot realiza o serie de testări suplimentare (fenotipice sau genotipice).

5. **Antibiograma** (verificarea sensibilităţii la antibiotice, în vederea stabilirii tratamentului) se va realiza de obicei prin metode difuzimetrice, dar în cazul unor infecţii grave trebuie să fie însoţită şi de determinarea concentraţiilor minime inhibitorii (CMI) şi respectiv bactericide (CMB). Antibiograma este recomandată insistent în cazul infecţiilor produse de *S. pneumoniae, M. tuberculosis, H. influenzae, S. aureus,* enterobacterii, *Pseudomonas aeruginosa* etc, în timp ce în infecţiile cu *L. pneumophila, Coxiella burnetii, M. pneumoniae, Chlamydia pneumoniae* etc se poate recomanda tratamentul antimicrobian în lipsa testării sensibilităţii la antibiotice pentru aceste microorganisme (în tratamentul tuberculozei nu se aşteaptă rezultatele antibiogramei, dar apariţia şi răspândirea tulpinilor rezistente şi multirezistente la medicamentele anti-tuberculoase reprezintă o preocupare extrem de serioasă).

Antifungigrama se poate realiza după o incubare de 24 de ore la 30°C pentru *C. albicans,* 48 ore pentru *C. neoformans* şi câteva zile pentru fungii filamentoşi, cu precauţia de a prepara inoculul cu 2-3 zile înainte de formarea sporilor sau conidiilor care au o altă sensibilitate la medicamentele antifungice, în comparaţie cu formele vegetative tinere. Antifungigrama nu este standardizată.

B. Diagnosticul de laborator imunologic poate fi serologic şi imunobiologic.

Atât din motive legate de cost-eficienţă, cât şi datorită necesităţii asigurării calităţii diagnosticului de laborator (uneori cu implicaţii foarte mari), analizele serologice nu pot fi realizate la toate nivelurile unde este pus la punct un laborator. Eliberarea unui buletin de analiză sau stabilirea unui diagnostic care va fi urmată de o anumită sancţiune terapeutică nu trebuie să permită apariţia unor erori, astfel încât, la nivelul unui laborator periferic vor trebui cunoscute perfect manevrele care duc la obţinerea unui eşantion potrivit de sânge, tehnicile de lucru aseptice, eventual modul de procesare a sângelui în vederea obţinerii serului, modul de stocare a serului şi modalitatea de transmitere a acestuia către cel mai apropiat laborator competent în domeniul serologic.

B.1. În cadrul **diagnosticului de laborator serologic** se va determina prezenţa anticorpilor necunoscuţi în serul pacientului respectiv, utilizând **antigene cunoscute** (reactivi comerciali). În diagnosticul serologic ne bazăm pe specificitatea reacţiilor antigen-anticorp dar trebuie să avem în vedere o serie de limite ale acestui tip de diagnostic după cum urmează:

- privind tipul anticorpilor care se doreşte a fi identificaţi şi respectiv privind tehnica de lucru abordată/recomandată trebuie luată o decizie, decizie care poate porni numai după analizarea cu rigurozitate a contextului clinic, paraclinic, epidemiologic (testarea „la întâmplare" este total contraindicată),
  - rareori se pot obţine date cu valoare diagnostică pe o singură probă de ser,
  - în ciuda faptului că reacţiile antigen-anticorp sunt specifice, pentru că există anumite asemănări structurale între diferite antigene, pot apărea reacţii încrucişate rezultând probleme de interpretare,
  - poate fi dificilă în anumite cazuri diferenţierea între răspunsul imun faţă de o infecţie recentă şi răspunsul imun „anamnestic", după întâlniri anterioare cu acelaşi antigen.

În principiu, utilizând diferite tehnici trebuie să putem răspunde la minim trei întrebări esenţiale, şi anume: dacă există anticorpi în serul pacientului investigat, care este titrul anticorpilor respectivi şi cum evoluează acest titru în dinamică, motiv pentru care se vor realiza minim două determinări diferite la un interval de 7-14 zile. Este recomandată recoltarea primului ser cât mai devreme după debutul bolii (serul se va păstra, preferabil la -20°C) urmată de recoltarea celui de al doilea ser şi determinarea prezenţei şi titrului anticorpilor în aceeaşi sesiune de lucru, pentru ambele seruri. O valoare a titrului de peste 4 ori mai mare în al doilea ser faţă de titrul din primul ser are o certă semnificaţie diagnostică.

În anumite situaţii, determinarea prezenţei şi titrului anticorpilor specifici de tip IgM în un singur ser recoltat de la pacient poate avea semnificaţie.

Tehnicile cu ajutorul cărora de realizează reacţiile antigen-anticorp în diagnosticul serologic al IACRI variază în funcţie de agentul etiologic presupus.

Spre exemplu, diagnosticul serologic în legioneloză este util retrospectiv datorită faptului că anticorpii specifici pot deveni titrabili într-un interval de 3-6 săptămâni; în aceste condiţii se recoltează primul ser conform recomandărilor uzuale în timp ce al doilea ser se recoltează după circa 6 săptămâni (reacţii de microaglutinare, imunofluorescenţă, contraimunelectroforeză). În forma pulmonară a febrei Q diagnosticul serologic este specific şi sensibil (RFC, microaglutinare, microimunofluorescenţă, ELISA). Infecţiile cu *M. pneumoniae* pot fi diagnosticate şi serologic prin reacţii de aglutinare la rece şi RFC.

În cazul în care se suspicionează o infecţie cu levuri, se poate cerceta (prin diferite metode) prezenţa unor anticorpi, însă fără o utilitate clinică demonstrată. În infecţiile cu *H. capsulatum*, diagnosticul serologic este important (reacţii de fixare a complementului, imunoprecipitare şi de imunodifuzie). Testele de imunodifuzie, RIA şi ELISA pot fi utile în diagnosticul serologic al infecţiilor produse de *B. dermatidis*. Având la bază antigenul micelian de fază al *C. immitis*, este posibilă realizarea unui diagnostic serologic (precipitare în tuburi, latex aglutinare, ELISA sau reacţii de fixare a complementului). Testele serologice pentru *Aspergillus spp.* prezintă un grad interes în aspergiloza bronhopulmonară alergică.

B.2. În cadrul **diagnosticului de laborator imunobiologic** se va studia de exemplu reactivitatea pacientului faţă de un anumit antigen inoculat. Intradermoreacţia la tuberculină (PPD, preparat proteic purificat) reprezintă un exemplu clasic în acest sens (vezi şi capitolele 21 şi 42). Tehnica intradermoreacţiei este folosită în mai multe scopuri şi trebuie să avem în vedere că în funcţie de scopul urmărit şi respectiv în funcţie de antigenul inoculat (respectiv în funcţie de mecanismul implicat), modul de citire al rezultatelor va fi diferit.

La 2-21 de zile după apariţia simptomelor infecţiei cu *C. immitis*, de regulă înainte de posibilitatea efectuării unui diagnostic serologic, IDR cu antigen extras din *Coccidioides* devine pozitiv (indurație > 5 mm). În maladia diseminată reacţia poate fi negativă.

Intradermoreacţia cu candidină este pozitivă la practic toate persoanele adulte, fiind astfel utilă nu în diagnosticarea unei infecţii cu candida, ci în aprecierea răspunsului imun mediat celular. Acelaşi lucru se poate afirma despre IDR cu toxoplasmină, eventual inclusă într-o baterie de teste (candidină, histoplasmină, tricofitină, antigen din *Clostridium tetani*, PPD).

În cadrul capitolului de faţă nu s-a dorit o prezentare exhaustivă a diagnosticului de laborator microbiologic pentru fiecare dintre microorganismele care ar putea fi implicate în etiologia IACRI. Am încercat să punctăm elementele cele mai importante ale acestui tip de diagnostic, cu exemple care considerăm că sunt sugestive pentru cititor.

În final, dorim să subliniem din nou faptul că diagnosticul microbiologic al IACRI reprezintă o necesitate, primele etape au o importanţă deosebit de mare, datele privitoare la modalităţile concrete de lucru pot fi (şi este bine să fie) cunoscute şi de către medicii clinicieni, **colaborarea** şi **cooperarea** între membrii unei echipe formate pentru un scop comun, vindecarea pacientului, sunt absolut **esenţiale**.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

53. ELEMENTE PRIVIND IMPORTANȚA DIAGNOSTICULUI MICROBIOLOGIC ÎN SISTEMUL DE SUPRAVEGHERE AL BOLILOR TRANSMISIBILE

Noţiuni privind supravegherea pentru sănătatea publică

Supravegherea reprezintă un proces continuu şi sistematic de colectare, prelucrare analiză şi interpretare a datelor precum şi diseminarea informaţiei pentru iniţierea unei acţiuni.

Supravegherea are o serie de obiective care trebuie să fie cât mai specifice, realiste şi orientate spre acţiune. Dintre acestea putem aminti monitorizarea tendinţei bolilor endemice, evaluarea unei intervenţii, detectarea izbucnirilor epidemice etc. Pentru îndeplinirea oricărui obiectiv este **necesar sprijinul laboratorului.**

Supravegherea poate fi considerată şi drept un instrument care favorizează prevenirea apariţiei infecţiilor şi oferă informaţiile necesare pentru instituirea diferitele activităţi în vederea scăderii impactului bolilor transmisibile asupra sănătăţii populaţiei.

Nivelele la care trebuie să fie realizată supravegherea bolilor transmisibile în România sunt următoarele: comunitatea respectivă (1); centrul de sănătate/unitatea sanitară/medicul de familie, la nivel local (2); autoritatea de sănătate publică la nivel judeţean, respectiv direcţiile de sănătate publică judeţene şi a municipiului Bucureşti (3); autoritatea de sănătate publică la nivel regional, respectiv cele 4 institute de sănătate publică din Bucureşti, Cluj, Iaşi şi Timişoara (4); autoritatea de sănătate publică la nivel naţional, respectiv direcţia generală de profil din ministerul sănătăţii şi respectiv centrul naţional înfiinţat în anul 2004 (5). În vederea colaborării cu Organizaţia Mondială a Sănătăţii (OMS) în ţara noastră este organizat biroul ofiţerului de legătură OMS (6). Datele colectate şi analizate sunt transmise către biroul regional OMS (EURO) care se află în Copenhaga.

Atât la nivel judeţean cât şi regional sunt organizate laboratoare de microbiologie şi serologie. La nivel naţional, majoritatea centrelor de referinţă se găsesc în structura INCD-MI „Cantacuzino".

În mod ideal, mass-media intervine în sistemul de supraveghere pentru sănătatea publică sesizând apariţia unor fenomene care merită atenţie (din păcate de cele mai multe ori căutarea forţată a „ştirilor excepţionale" creează mai multe probleme decât beneficii). În anii 90', au fost organizate o serie de ateliere de lucru în care au participat atât medici implicaţi în supravegherea pentru sănătatea publică a bolilor transmisibile cât şi ziarişti, oameni de televiziune etc. în vederea punerii la punct a unei atitudini comune, pozitive, utile sănătăţii publice. Aceste ateliere de lucru au reprezentat un deosebit succes. Din păcate, atât colegii din mass-media care au fost pregătiţi cât şi o bună parte dintre colegii din sistemul sanitar au părăsit sistemele din care făceau parte, în special datorită faptului că au găsit un serviciu cu o salarizare decentă.

Rolul laboratorului

În cele ce urmează dorim să ne referim la câteva dintre cele mai importante roluri ale laboratoarelor de microbiologie şi serologie în supravegherea bolilor transmisibile.

BCU "VICTOR BABEŞ" TIMIŞOARA LIBRARY

La **nivelul comunităţii locale** nu se realizează, de regulă, activităţi în domeniul laboratorului. Totuşi, este de menţionat faptul că în cazul unei izbucniri epidemice sau în cazul suspicionării apariţiei unui eveniment epidemiologic, comunitatea locală trebuie să sprijine toate activităţile legate de investigarea respectivului eveniment printre care şi recoltarea produselor patologice care ar putea servi la izolarea şi identificarea unui agent patogen.

În cadrul **unităţilor sanitare situate la nivel local,** fie că este vorba de un cabinet medical individual, un cabinet are grupează mai mulţi medici de familie, un centru de sănătate sau o altă formă de organizare, există posibilitatea punerii la punct a unui mic laborator care să poată participa la diagnosticarea din punct de vedere etiologic a cazurilor suspecte. În cazul în care aceasta activitate este posibilă, personalul de laborator trebuie să aibă la dispoziţie şi să utilizeze protocoale standardizate pentru prelucrarea fiecărui produs patologic în parte. În cazul în care activitatea diagnostică nu este posibilă, personalul medical trebuie să aibă la dispoziţie şi să utilizeze protocoale standardizate privind recoltarea şi transportul produselor patologice care vor fi trimise către nivelul următor.

Din punctul de vedere al raportării rezultatelor, unităţile sanitare situate la nivel local trebuie să fie implicate în raportarea unor rezultate de laborator, în cazul în care desfăşoară astfel de activităţi (conform normativelor legale în vigoare).

În cazul izbucnirii epidemice, personalul medical aflat în unităţi sanitare la nivel local va fi implicat în colectarea, stocarea şi transportul (în condiţii care vor permite evitarea oricăror riscuri) produselor patologice în vederea testărilor de laborator, către nivelul superior. În funcţie de dotare şi pregătire, la nivel local ar fi posibilă utilizarea datelor utilizate în cursul investigaţiei, inclusiv a datelor de laborator, pentru confirmarea izbucnirii epidemice respective precum şi înregistrarea şi prelucrarea datelor de laborator.

În cadrul **direcţiilor de sănătate publică** există laboratoare de microbiologie şi serologie. În funcţie de dotarea acestor laboratoare precum şi în funcţie de cunoştinţele teoretice şi tehnice ale personalului medical se pot desfăşura mai multe activităţi. Nivelul judeţean poate să ajute nivelul local în realizarea oricăreia dintre activităţile menţionate mai sus, pornind de la recoltarea şi transportul produselor patologice şi până la izolarea şi identificarea agentului infecţios incriminat. În cazul în care sunt necesare teste suplimentare, tulpinile izolate (sau serurile) vor fi trimise către forul superior. Din punctul de vedere al raportării, direcţia de sănătate publică judeţeană trebuie să trimită rezultatele obţinute în laborator atât către nivelul superior cât şi spre nivelul local (**feedback**). În ceea ce priveşte rolul în cursul investigării unei posibile izbucniri epidemice, personalul tehnic şi de specialitate al direcţiei de sănătate publică va asista colegii de la nivel local în toate activităţile legate de recoltarea, stocarea şi transportul produselor patologice respectând normele de asepsie şi antisepsie. La nivelul direcţiei de sănătate publică trebuie să se centralizeze şi interpreteze datele obţinute pe parcursul izbucnirii epidemice, inclusiv rezultatele de laborator. Decizia confirmării sau infirmării unei izbucniri epidemice aparţine tot autorităţii de sănătate publică de la nivelul judeţean, pe baza analizei rezultate în urma interpretării tuturor datelor colectate. În cazul că izbucnirea epidemică este confirmată, direcţia de sănătate publică judeţeană are datoria să raporteze acest eveniment către nivelurile superioare, respectând normativele legale în vigoare. Modul de informare operativă în probleme de epidemiologie şi igienă este reglementat prin Ordinul ministrului sănătăţii nr. 8/2000.

Un alt rol foarte important al direcţiei de sănătate publică este în legătură cu activitatea de pregătire (teoretică şi practică) atât a personalului propriu cât şi a personalului medical şi tehnic de la nivelul inferior. La nivel judeţean se pot organiza (eventual cu sprijinul tehnic al institutului de sănătate publică coordonator) sesiuni de pregătire, ateliere de lucru, mese rotunde, cursuri etc. Pe de altă parte, direcţia de sănătate publică are datoria de a facilita pregătirea personalului propriu la nivel regional sau naţional.

Institutele de sănătate publică din Bucureşti, Cluj-Napoca, Iaşi şi Timişoara sunt organizate de către ministerul sănătăţii, pentru a îndeplini rolul de for tehnic si profesional în vederea elaborării şi fundamentării ştiinţifice şi profesionale a strategiilor specifice de politică sanitară (prevenirea bolilor şi promovarea sănătăţii populaţiei). Institutele de sănătate publică elaborează propuneri metodologice pentru programele naţionale de sănătate publică, împreună cu direcţiile de sănătate publică judeţene si a municipiului Bucureşti. Conform legii, institutele de sănătate publică efectuează studii în domeniul sănătăţii publice, elaborează proiecte de norme, metodologii şi instrucţiuni privind sănătatea publică, asigură consultanţă de specialitate, colaborează cu organizaţii şi instituţii internaţionale, participă la procesul de învăţământ medical de specializare şi perfecţionare în domeniul sănătăţii publice etc.

Direcţia generală de sănătate publică şi inspecţie sanitară de stat din ministerul sănătăţii reprezintă nivelul superior al piramidei supravegherii bolilor transmisibile în România. Principial, la fel ca şi în majoritatea ţărilor europene, activităţile de sănătate publică şi de inspecţie nu ar trebui să fie îndeplinite de aceeaşi structură. Acest aspect a fost rezolvat în anul 1999 atunci când în întreaga ţară, atât la nivel central cât şi la nivel judeţean au fost organizate structuri diferite pentru activităţi diferite. Din păcate, după anul 2001 s-a revenit la sistemul bazat pe un model apărut după al doilea război mondial ceea ce după părerea autorului acestui manual a reprezentat un pas înapoi şi implicit o întârziere în realizarea reformei sistemului de supraveghere al bolilor transmisibile, în România. În baza Legii nr. 100/1998, ministrul sănătăţii a aprobat ordinul nr. 1144/2004 privind înfiinţarea **Centrului naţional de supraveghere şi control al bolilor transmisibile.** Doresc să subliniez faptul că prin Hotărârea Guvernului României nr. 1332/2000 privind organizarea şi funcţionarea Ministerului Sănătăţii, publicată în Monitorul Oficial nr. 698/2000, în structura ministerului a fost inclusă **Direcţia de supraveghere, prevenire şi control al bolilor transmisibile.** Din păcate, această prevedere a fost eliminată ulterior trecând încă patru ani până la apariţia ordinului menţionat mai sus, un nou motiv de întârziere a reformei sistemului de supraveghere şi control al bolilor transmisibile.

În cazul unei izbucniri epidemice sau apariţiei unei epidemii, nivelul central are datoria ca pe lângă alertarea sistemului de laboratoare implicate în izolarea şi identificarea şi izolarea posibilului agent patogen să faciliteze din punctul de vedere al obţinerii materialelor, mediilor, reactivilor necesari, sau din punct de vedere logistic toate activităţile de laborator necesare, de la recoltarea produselor patologice şi până la identificarea agentului etiologic şi a sensibilităţii acestuia la antibiotice şi chimioterapie, după caz.

Atunci când rezultatele de laborator trebuie completate cu investigaţii de fineţe, realizate la nivel naţional, centrele de referinţă susţinute de ministerul sănătăţii trebuie să obţină rezultatele necesare, să facă interpretările acestora, să realizeze analize de sinteză pe care să le trimită în cel mai scurt timp posibil către ministerul sănănăţii şi către autorităţile de sănă-

tate publică regionale şi judeţene implicate în investigarea respectivului eveniment epidemiologic. De la nivelul naţional se poate solicita recoltarea unor produse patologice suplimentare, după caz.

În anumite situaţii, personalul tehnic de la nivelul direcţiei generale de sănătate publică sau de la nivelul centrelor de referinţă, în colaborare cu personalul tehnic de la nivelul institutelor de sănătate publică se va deplasa în teritoriu pentru a sprijini activitatea colegilor la nivel local sau la nivel judeţean.

La nivel naţional, cu sprijinul tehnic al altor unităţi aflate sau nu în structura ministerului sănătăţii, sunt elaborate politicile în domeniul supravegherii bolilor transmisibile în general, respectiv poziţia laboratorului de microbiologie şi serologie în cadrul acestor activităţi. Centrele naţionale de referinţă pentru laborator au datoria să elaboreze toate materialele tehnice, procedurile standard pentru fiecare activitate de laborator în parte, manualele tehnice precum şi alte materiale care trebuie puse la dispoziţia tuturor laboratoarelor din ţară, indiferent dacă fac parte din sistemul public sau privat, după aprobarea acestora de către ministerul sănătăţii, după caz. Centrele de referinţă au de asemenea o poziţie cheie în ceea ce priveşte asigurarea calităţii în sistemul de sănătate, supervizarea activităţii şi pregătirea în domeniu. Centrele naţionale de referinţă trebuie să formuleze opinii şi recomandări privind resursele umane şi materiale în domeniul activităţii de laborator la nivel naţional, iar aceste recomandări să fie luate în seamă şi implementate de către autoritatea competentă din punct de vedere administrativ.

Relativ recent, se insistă foarte mult pe ideea acreditării a laboratoarelor (elaborându-se şi o serie de acte normative în acest sens), o activitate foarte costisitoare şi care destul de probabil nu va rezolva problemele existente. Firește, legile elaborate de Parlamentul României trebuie respectate. Totuşi, doresc să menţionez că în vederea realizării unei mai bune activităţi în domeniul diagnosticului sau supravegherii bolilor transmisibile prin metode de laborator este esenţială **asigurarea calităţii;** realizarea controlului intern şi extern de calitate ceea ce ar trebui să reprezinte **prioritatea absolută** a întregului sistem de sănătate.

Din punctul de vedere al raportării, nivelul naţional asigură integrarea atât a sistemului privat cât şi a sistemelor ministerelor cu reţea sanitară proprie (ex. ministerul transporturilor, ministerul justiţiei etc) în reţeaua naţională de supraveghere a bolilor transmisibile. La nivel naţional se primesc informaţiile necesare supravegherii pentru sănătatea publică a bolilor transmisibile, aşa cum este precizat în normativele legale în vigoare privind fluxul informaţional.

Un rol important la nivel naţional este reprezentat de asigurarea retroinformării (**feedback**) tuturor nivelurilor implicate.

În loc de concluzii

În România a existat practic dintotdeauna un sistem de supraveghere pentru sănătatea publică, adaptat periodic dar în mod variabil, în funcţie de guvernele care s-au succedat. Dacă în perioada 1990-1991 evoluţia sistemului părea să fie foarte bună, din 1992 interesul acordat acestui subiect a scăzut dramatic. În special începând cu anul 1998, inclusiv cu "sprijinul" unor recomandări şi decizii internaţionale a reînceput un proces susţinut de reformare a sistemului de supraveghere din ţara noastră. Spre ex. prin Ordonanţa Guvernului

nr. 53/2000 a fost instituită obligativitatea raportării bolilor şi a efectuării vaccinărilor, ordonanţă care însoţind Legea nr. 100/1998 reprezintă o referinţă din punct de vedere legislativ pentru sistemul de sănătate publică din România.

Activitatea la nivel naţional a fost recunoscută de către forurile internaţionale de prestigiu rezultând colaborări cu Organizaţia Mondială a Sănătăţii, Centrul de Prevenire şi Control al Bolilor (CDC – Atlanta, Georgia) etc. Astfel, proiectele noastre în domeniu au căpătat un contur european odată cu aprobarea în anul **2000** a proiectului pe care l-am propus special pentru reforma sistemului de supraveghere şi control al bolilor transmisibile şi care a adus României fonduri PHARE de 4 milioane EUR. Din păcate, după opinia mea, proiectul a început să se desfăşoare abia în anul 2003 şi s-a încheiat în anul 2004. În orice caz, în cadrul proiectului a fost acordată atenţie laboratorului de microbiologie realizându-se dotări la nivelul centrelor de referinţă, la nivelul institutelor de sănătate publică, la nivelul unor direcţii de sănătate publică. În plus, tot în cadrul acestui proiect am fost solicitat să organizez cursuri de supra-specializare în ceea ce priveşte diagnosticul microbiologic al unor boli transmisibile considerate ca fiind prioritare în România. Aceste cursuri s-au desfăşurat în INCDMI "Cantacuzino", cu susţinerea colegilor din centrele de referinţă şi au fost deosebit de apreciate atât de către participanţi (medici microbiologi din direcţiile de sănătate publică, medici microbiologi din spitale cu profil de boli infecţioase, medici epidemiologi) cât şi de evaluatorii externi, personalităţi din Health Protection Agency, Colindale, UK.

Sistemul de supraveghere a bolilor transmisibile românesc a fost integrat în reţele internaţionale de supraveghere, precum Reţeaua Balcanică de supraveghere a bolilor transmisibile (iniţiată în anul 1999, România fiind membru fondator) sau Reţeaua de supraveghere a bolilor transmisibile din Europa Centrală şi de Est (fondată în anul 2000, prima întâlnire fiind organizată în România la iniţiativa noastră).

România raportează datele semnificative privind supravegherea bolilor transmisibile către biroul regional al Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii, respectând reglementările internaţionale aflate în vigoare.

Ministerul sănătăţii trebuie să susţină energic toate activităţile de raportare a bolilor transmisibile la nivelul întregului sistem de supraveghere pentru sănătatea publică.

Nu vom discuta în acest capitol problematica legată de sistemele de supraveghere „verticale" (infecţia HIV/SIDA, infecţia cu *Mycobacterium tuberculosis*/ tuberculoza, infecţiile transmisibile sexual) care ar putea necesita redactarea unor manuale special dedicate. Este însă bine ca acei colegi care vor citi rândurile de faţă să fie sensibilizaţi faţă de existenţa acestor aspecte pentru că fiecare în parte reprezintă probleme de sănătate publică foarte importante, în care implicarea diagnosticului de laborator este esenţială.

BCU IAŞI "M. EMINESCU" IAŞI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B C.U "M. EMINESCU" IASI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14883/0
7

ISBN 973-7912-37-3

SU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY